AKTIVITÄT UND VERTEILUNG VON SUPPRESSORZELLEN BEI LEBERTRANSPLANTIERTEN SCHWEINEN UND UNTERSUCHUNGEN ZUM IMMUNSTATUS NIERENTRANSPLANTIERTER PATIENTEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

HELMUT DEGEN

aus Uhingen

1983

AKTIVITÄT UND VERTEILUNG VON SUPPRESSORZELLEN BEI LEBERTRANSPLANTIERTEN SCHWEINEN UND UNTERSUCHUNGEN ZUM IMMUNSTATUS NIERENTRANSPLANTIERTER PATIENTEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

HELMUT DEGEN

aus Uhingen

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung	30. Juni 1983
Dekan	Professor Dr. K. P. Hadeler
1. Berichterstatter	Privatdozent Dr. D. Baron
2. Berichterstatter	Professor Dr. W. Bessler

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Herrn Privatdozent Oberarzt Dr. H. Bockhorn danke ich für die Ermöglichung dieser Dissertation.

Bei Herrn Privatdozent Dr. D. Baron bedanke ich mich für die gute Betreuung und bei Herrn Professor Dr. W. Bessler für sein entgegengebrachtes Interesse.

Für hilfreiche Diskussionsbeiträge möchte ich mich nicht zum Schluß bei Herrn Dipl. Biol. M. Smetak bedanken.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543907_0038

Im Text wurden folgende Abkürzungen verwendet:

ATG	Antithymozytenglobulin
CML	Cell-mediated Lympholysis
Con A	Concanavalin A
cpm	counts per minute
Cr	Chrom
Cs-A	Cyclosporin A
CTX	Complementabhängiger Cytotoxizitätstest
FCS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
HLA	Human Leukocyte Antigen
IFL	Indirekte Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
LDS	Low Dose Steroids
MHC	Major Histocompatibility Complex
MLC	Mixed Lymphocyte Culture
PBL	Periphere Blut-Lymphozyten
PHA	Phytohämagglutinin
R	Responder
RFC	Rosette Forming Cells
RPMI	Rosewell Park Memory Institute
S	Stimulator
SRBC	Sheep Red Blood Cells
SSR	Specific Standardized Release
STEX	Streptomycetenextrakt
Ts	T-Suppressorzelle

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1	Problemstellung und Zielsetzung	8
2.	MATERIAL	10
2.1	Versuchstiere	10
2.2	Patientengut	10
2.3	Medien	11
2.4	Antiseren	12
2.5	Andere Materialien und Reagenzien	12
2.6	Geräte	13
3.	METHODEN	15
3.1	Zellisolierungen	15
3.1.1	Isolierung von Lymphozyten aus peripherem Blut	15
3.1.2	Isolierung von Lymphozyten aus humaner Milz	15
3.1.3	Isolierung von Lymphozyten aus Schweinemilz	15
3.1.4	Lymphozytenpräparation aus Schweineleber	16
3.1.5	Abtrennung von Makrophagen und Monozyten durch Adhärenz	16
3.2	Einfrieren und Auftauen von Lymphozyten	17
3.3	Trennung von T- und B-Lymphozyten	17
3.4	Methoden zur Hemmung der Zellteilung und der Translation	18
3.4.1	Mitomycin C-Behandlung	18
3.4.2	Bestrahlung	18
3.5	Komplementinaktivierung im Serum	19
3.6	Zelluläre Teste	19
3.6.1	Gemischte Lymphozytenkultur	19
3.6.2	Autologe humane gemischte Lymphozytenkultur	20
3.6.3	Suppressor-Test mit Zellen aus MLC-Kulturen	20
3.6.4	Suppressor-Test mit frisch isolierten Lymphozyten	21
3.6.5	Cell-mediated Lympholysis	22
3.6.5.1	MLC-Ansatz	22
3.6.5.2	Isolierung der cytotoxischen T-Lymphozyten	22

		Seite
3.6.5.3	Behandlung der Targetzellen	22
3.6.5.4	Bestimmung des Spontanrelease	23
3.6.5.5	Ansatz der CML	23
3.6.6.6	Lymphozytenstimulation	24
3.7	Serologische Teste	24
3.7.1	Indirekte Immunfluoreszenz	24
3.7.2	Complementabhängiger Cytotoxizitätstest	25
3.7.3	Agar-Immundiffusion	25
3.8	Radioaktive Markierungen von Antikörpern	26
3.8.1	Markierung mit Tritium	26
3.8.2	Markierung mit Jod-125	26
3.9	Radioimmunoassay	27
3.9.1	RIA mit isolierten Lymphozyten	27
3.9.2	RIA mit Vollblut	28
3.10	E-Rosetten mit Schafserythrozyten	28
3.10.1	Herstellen der Schafserythrozytensuspension	28
3.10.2	Bestimmung der aktiv rosettierenden Zellen	28
3.10.3	Bestimmung der hoch-affinen rosettierenden Zellen	29
3.10.3	Bestimmung der nieder-affinen rosettierenden Zellen	29
3.10.5	Bestimmung der gesamt rosettierenden Lymphozyten	29
4.	ERGEBNISSE	30
4.1	Untersuchungen zum Suppressor-Testsystem	30
4.1.1	Suppressorzellnachweis in der gemischten Lymphozytenkultur	30
4.1.2	Suppressorzellnachweis in einer autologen Lymphozytenkultur	32
4.1.3	Spezifische und unspezifische Suppressorzellen	34
4.1.4	Charakterisierung eines Suppressorzellfaktors	35
4.1.5	Beeinflußung der Test-MLC durch lösliche Faktoren aus verschiedenen Lymphozytenkulturüberständen	37
4.1.6	Suppressorzellaktivierung durch Histamin	41
4.1.7	Suppressorzellaktivierung durch Concanavalin A	43
4.1.8	Einfluß eines Streptomycetenextraktes auf die Ts-Zellbildung und mitogene Aktivität	44

		Seite
4.2	Untersuchungen zur Suppressoraktivität nach Schweineorgantransplantationen	47
4.2.1	Suppressorzellaktivität bei allogener Lebertransplantation am Schwein	47
4.2.2	In vitro Wirkung von kultivierten Suppressorzellkulturen auf die Bildung von cytotoxischen T-Lymphozyten vor und nach einer Lebertransplantation beim Schwein	49
4.2.3	Suppressorzellbestimmung an Milzzellen, Lymphknotenzellen und Lymphozyten aus peripherem Blut bei nichttransplantierten Schweinen	50
4.2.4	Suppressorzellbestimmung an Milzzellen, Lymphknotenzellen und peripheren Lymphozyten bei lebertransplantierten Schweinen	52
4.2.5	Suppressorzellbestimmung an Milzzellen, Lymphknotenzellen und peripheren Lymphozyten bei nierentransplantierten Schweinen	53
4.2.6	Suppressoraktivität von Leberzellen	55
4.3	Immunstatus bei nierentransplantierten Patienten	58
4.3.1	Suppressoraktivität in vitro von peripheren Lymphozyten nierentransplantierter Patienten	58
4.3.2	Bestimmung von E-Rosetten	67
4.3.2.1	E-Rosetten mit Lymphozyten der Kontrollpersonen	67
4.3.2.2	E-Rosetten mit Lymphozyten von nierentransplantierten Patienten	70
5.	DISKUSSION	78
5.1	Suppressor-Test System	78
5.2	STEX-induzierte Suppressorzellen	83
5.3	Suppressoraktivität nach Lebertransplantation beim Schwein	84
5.4	Suppressorzellgenerierung bei nierentransplantierten Patienten	87
5.5	E-Rosettenbestimmung	89
6.	ZUSAMMENFASSUNG	92
7.	LITERATURVERZEICHNIS	93

1. Einleitung

Das Immunsystem, obwohl noch nicht in allen Einzelheiten verstanden, ist in seiner Funktion als Abwehr gegen Bakterien, Viren, Pilze, Helminthen, Proteine, große Kohlenhydrat- und anderen Makromolekülen sicher eine wesentliche Voraussetzung der herausragenden evolutionären Entwicklung der Vertebraten. Als das in der Evolution älteste System der Abwehrreaktionen kann wohl die Phagozytose angesehen werden, wobei ein Fremdkörper durch Umfließen in die Zelle aufgenommen und in den Lysosomen intrazellulär verdaut, also unschädlich gemacht wird. Für die exzellente Funktion des entwickelten Immunsystems mußten aber weitere Eigenschaften geschaffen werden: Erkennung von "Selbst" und "Nicht Selbst" Spezifität, Gedächtnis mit Spezifität und nach neueren Erkenntnissen das Erkennen von "modifiziertem Selbst". Das heißt, es müssen Effektormechanismen bestehend aus frei agierenden Molekülen und Zellen vorhanden sein, die spezifisch mit körperfremdem Material , den Antigenen,reagieren können. Diese Spezifität muß dann erhalten bleiben, so daß bei einer zweiten und jeder weiteren Antigenstimulation eine schnellere und intensivere Immunantwort ermöglicht wird (1,2).

Phylogenetisch gesehen erfüllt diese Bedingungen die Gruppe der Vertebraten, aber nicht die der Invertebraten. Dies steht in direktem Zusammenhang mit der phylogenetischen Entwicklung des Lymphgewebes.

Die ontogenetische Entwicklung des Immunsystems geht postnatal von im Knochenmark lokalisierten Stammzellen aus. In der foetalen Phase sind aber schon multipotente hämopoetische Stammzellen zuerst im Dottersack, in späteren Stadien in Leber und Milz feststellbar. Die Stammzellen differenzieren in den zentralen, oder primären Lymphorganen in mehreren Schritten zu immunkompetenten Zellen und der größte Teil wandert dann in die peripheren, oder sekundären Lymphorgane ein. Hier erfolgt durch antigene Stimulation die weitere Differenzierung und Entwicklung zu Effektorzellen, die zur direkten "Fremdeliminierung" eingesetzt werden (3).

Für die Effizienz und Spezifität der Immunantwort werden funktionell verschiedene Zelltypen benötigt. Sie können u.a. durch membranständige Marker und Rezeptoren unterschieden werden (4).

Ein Antigen verursacht nach dem Eindringen in den Vertebratenorganismus eine Reaktion, die in zwei Formen, meistens aber zusammen auftritt: Die humorale und die zellvermittelte Immunantwort. Bei der humoralen Immunantwort werden B-Lymphozyten aktiviert und dazu veranlaßt zu proliferieren und Antikörper zu synthetisieren, welche dann die Antigene durch Agglutination, Präzipitation und komplementabhängige Reaktionen unschädlich machen. T-Lymphozyten werden bei der zellvermittelten Immunantwort stimuliert, dadurch ebenfalls zur Zellteilung angeregt, und die gebildeten T-Zellen können dann Effektorfunktionen gegen zellständige Antigene ausüben.Bei all diesen Prozeßen muß natürlich die anfangs erhobene Forderung der Erkennung von "Selbst" gewährleistet sein.

Abbildung 1 zeigt den derzeitigen Stand der wissenschaftlichen Diskussion, wie die Induktion und der Ablauf der zellvermittelten und humoralen Immunantwort bei Eindringen eines Virus oder Antigens in den Organismus aussehen könnte: Alle kernhaltigen Zellen exprimieren in der Zellmembran verankerte, sogenannte MHC-Antigene (2). Dies sind Genprodukte eines Chromosomenabschnittes (bei der Maus Chromosom 17, beim Mensch Chromosom 6) der als Haupthistokompatibilitätskomplex, MHC (für major histocompatibility complex), bezeichnet wird. MHC-Antigene sind für jedes Individuum spezifisch und stellen somit das Zeichen für "Selbst" dar. Die Genprodukte des MHC werden seit einiger Zeit in drei Klassen eingeteilt (5,6), wobei aber bemerkt werden muß, daß die Komplexität des MHC noch nicht in allen Einzelheiten verstanden worden ist.

Wird nun eine Zelle von einem Virus befallen, exprimiert die Zelle an ihrer Oberfläche zusätzlich zu Klasse I-Antigenen virale Antigene bzw. antigene Epitope (7). Bestimmte Makrophagen können nach Aufnahme und Verarbeitung antigene Fragmente an ihrer Oberfläche "präsentieren" (8,9,10,11). Außerdem tragen diese Zellen, wie schon erwähnt, MHC-Antigene. Durch diese zwei "Signale", virales Antigen-

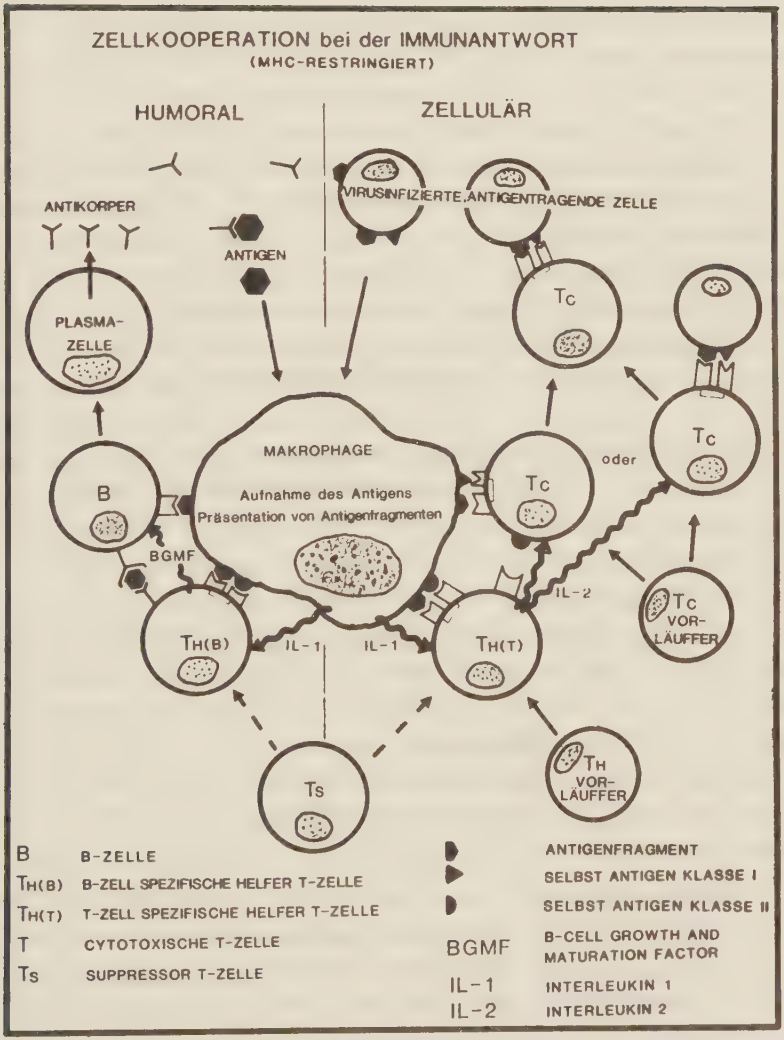

ABBILDUNG 1 Modell der Zellkooperation bei der Immunantwort. Erklärung im Text(modifiziert nach WAGNER (22)).

fragment und ein Klasse II- oder Ia-Antigen, zusammen mit einem von den Makrophagen freigesetzten löslichen Faktor, dem Interleu-

kin 1 (früher LAF) (12,13,14,15), werden sogenannte T-Helferlymphozyten (T_H) aktiviert, die dadurch ihrerseits in die Lage versetzt werden, einen weiteren löslichen Faktor, das Interleukin 2 (früher TCGF) (16,17,18,19) zu produzieren und zu sezernieren. Für T_H-Zellen müssen deshalb Rezeptoren postuliert werden, die "Fremd" (virales Antigen) und "Selbst" (Klasse II-Antigen) erkennen können. Das freigesetzte Interleukin 2 aktiviert dann sogenannte cytotoxische T-Lymphozyten (T_C) (20,21,22), die wiederum mittels Rezeptoren virales Antigen und Klasse I-Antigen (23), entweder über Präsentation von Makrophagen oder direkt von der virusinfizierten Zelle, erkennt. Dadurch erhält die Zelle die Fähigkeit, spezifisch die virusbefallene Zelle abzutöten (24).

Diese Spezifität der Interaktion zwischen cytotoxischer T-Zelle und der Zielzelle unterliegt nach ZINKERNAGEL (25) einer strengen MHC-Restriktion, d.h., die virusbefallene Zielzelle und die T_C- Zelle müssen die gleichen Klasse I-Antigene exprimieren. Nicht MHC-restringiert dagegen sind die aktivierenden Signale von Interleukin 1 und -2. Dem hier in der Abbildung vorgestellten Modell der "dual recognition" steht die Theorie des "altered self", die besagt, daß die T-Zellen nur einen Rezeptor zur Erkennung der entsprechenden Strukturen benötigt (25).

Bei der humoralen Immunantwort wird ebenfalls das von Makrophagen (26) präsentierte Antigenfragment zusammen mit Ia-Antigenen von Rezeptoren einer diesmal B-zellspezifischen T-Helferzelle $T_{H(B)}$ erkannt, die wiederum durch das von Makrophagen sezernierte Interleukin 1 aktiviert wird. Über die"Antigenbrücke" (27,28) und den von $T_{H(B)}$ sezernierten B-Zellwachstumsfaktor (BGMF, B-cell growth and maturation factor)(29) werden B-Zellen, die mittels Rezeptoren antigene Fragmente auf Makrophagen erkannten, zur Proliferation und zur Antikörpersynthese angeregt. Die von den B-Zellen an ihrer Oberfläche exprimierten Rezeptoren besitzen gemäß der klonalen Selektionstheorie (30) nur eine Antigenspezifität, die genetisch festgelegt ist (31). Die Vielfaltigkeit der Rezeptoren kann durch die These der somatischen Mutation erklärt werden (32).

Diesen aktivierenden Prozeßen bei zellulärer und humoraler Immunantwort stehen jeweils Antagonisten in Form von Suppressor T-Zellen, T_S, gegenüber. Sie haben mit T-Helferzellen eine primär regulatorische Funktion gemeinsam (33,34,35): Dabei werden wahrscheinlich verschiedene immunologische Reaktionen durch unterschiedliche T_S-Subpopulationen beeinflußt. Die Aktivierung der Suppressorzellen ist nicht unbedingt von einer spezifischen Antigenstimulation abhängig (36,37), es existieren,vor allem in der Milz lokalisiert, Suppressorzellen, welche auch ohne antigenen Stimulus unspezifische Effekte auf Immunreaktionen ausüben können (38,39,40). Suppressorzellen könnten auf antigen-spezifische Vorläuferzellen, auf Helferzellen und auch auf akzessorische Zellen der Monozyten-Makrophagenreihe wirken. Es ist aber sicher davon auszugehen, daß verschiedene Phasen der gesamten Immunantwort von unterschiedlichen Suppressorzellen beeinflußt werden können und somit eine Feinregulierung der Immunantwort stattfindet.

Das Immunsystem eines Individuums zeigt aber nicht nur seine effektive Abwehrleistung bei Eindringen von Erregern oder anderen Molekülen, sondern auch bei einem in der Natur nicht vorkommenden, von Menschen geschaffenen Prozeß: Der allogenen und xenogenen Transplantation.

Wissenschaftliche Transplantationsversuche hatten ihren Ursprung im 18. Jahrhundert durch Vereinigungen von Süßwasserpolypen(TREBLEY) und Süßwasserwürmen (BONNET) sowie einer xenogenen Zahnübertragung (HUNTER)(41). BARONIO (42) beschrieb aufgrund von allogenen Hauttransplantationen am Schaf 1804 die Entwicklung von Abstoßungsreaktionen, aber erst über ein Jahrhundert später konnten LOEB (43) und TYZZER (44) die Korrelation zwischen Entwicklung einer Abstoßungsreaktion und genetischen Merkmalen des Transplantats an der Maus zeigen. GORER (45) definierte dann 1936 ein genetisches System bei der Maus, später als H-2 System bezeichnet, während SNELL (46) 1948 den Begriff Histokompatibilitätsantigene bzw. Transplantationsantigene prägte. Ihm gelang es mit Hilfe kongener Mausinzuchtstämme die Wirkung und Funktion der Histokompatibilitätsantigene isoliert zu untersuchen. Vier Jahre zuvor erbrachte MEDAWAR (47) den Nachweis

über die immunologische Natur der Transplantatabstoßung. Er konnte die Induktion eines Gedächtnisses und die Spezifität des Gedächtnisses nachweisen. Das dem H-2 System der Maus äquivalenten HLA-System beim Mensch wurde 1958 von DAUSSET (48) beschrieben und in den folgenden Jahren hatten insbesondere PAYNE, VAN ROOD, CEPPELINI und KISSMEYER-NIELSEN großen Anteil an der weiteren Aufklärung seiner Struktur.

Erst der "Umweg" über die Transplantation und dadurch die Beteiligung der vom MHC codierten Zellmembranstrukturen führten also zum näheren Verständnis des mit Zellselektion und -kooperation arbeitenden Immunsystems. Nicht zu vergessen ist hierbei die in den letzten Jahren enorme Entwicklung der in vitro Lymphozytenkultivierungstechnik sowie die Herstellung monoclonaler Antikörper durch die Hybridom-Technik (49).

Die Immunreaktionen bei einer allogenen Transplantation führten im allgemeinen zu einer Abstoßung des Transplantats. Daß hierfür zwar der Kontakt mit Histokompatibilitätsantigenen notwendig aber nicht unbedingt ausreichend ist, zeigten WELSH (50), LAFFERTY et al (51) und Bach et al (52). Der genaue Induktionsmechanismus ist bis dato noch nicht genau erkannt, es sind noch mehrere Hypothesen in der Diskussion (53-58). Die Abstoßungsreaktion läßt sich in der Abfolge in einen afferenten Teil, einen zentralen und einen efferenten Teil untergliedern. Der afferente Teil umfaßt den Antigenerkennungsprozeß, der zentrale die Differenzierungsprozesse im lymphytischen Apparat und der efferente Teil bezieht sich auf die im Transplantat selbst ablaufenden, zur Abstoßung führenden Vorgänge. Die Abstoßung eines Ersttransplantats, ohne Vorsensibilisierung des Empfängers, geschieht in der Regel nach sechs bis sieben Tagen. Die Stärke der Immunreaktion kann aber große Unterschiede aufweisen, wenn die Transplantation verschiedener Organe, bei gleicher genetischer Konstellation, betrachtet wird. Hauttransplantate unterliegen sowohl bei vielen Versuchstierspecies als auch beim Mensch einer stärkeren Abstoßungsreaktion als parenchymatöse Organe wie Niere, Leber oder Herz. Aber auch bei diesen Organen sind unterschiedliche Abstoßungsreaktionen festzustellen. Bei der Ratte (59) wie auch beim Schwein (60,61) wer-

den Lebertransplantate weniger stark abgestoßen als Nierentransplantate, dies zum Teil ohne immunsuppressive Therapie.

Besonders zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang das Phänomen des "privilegierten Ortes". In der vorderen Augenkammer z.B. können allogene Haut und allogenes Schilddrüsengewebe, trotz Vorhandensein von MHC-Antigenen, praktisch unbegrenzt überleben (62). Die klinische Relevanz dieses Umstandes liegt in der problemlosen Transplantation von Hornhautgewebe.

Die in den letzten Jahren in großem Maße stattgefundene Entwicklung der Organtransplantation führte zu einer wachsenden Zahl von klinischen Transplantationen, besonders von Nierentransplantationen. Die Auswahl der Transplantatempfänger wird nach Typisierungen des MHC- und ABO-System von Spender und Empfänger vorgenommen, wobei die Typisierungen größtmögliche Übereinstimmung zeigen sollten. Es ist aber praktisch für einen Transplantationserfolg immer notwendig, eine immunsuppressive Therapie durchzuführen, deren Anwendung zur Zeit noch weitgehend auf empirischer Grundlage beruht. Die nach einer Transplantation auftretenden zellulären und humoralen Immunreaktionen werden durch Kombinationstherapien aus Cortikosteroiden (63), Zytostatika(z.B. Azathioprin) (64), Antilymphozytenseren und seit kurzem Cyclosporin A (66) unterdrückt. Die Gabe von Steroiden und Azathioprin stellt im allgemeinen eine Dauerbehandlung dar, wobei man in jüngster Zeit dazu überging, niedrige Dosen in Verbindung mit gezielten Gaben von Antilymphozytenseren in den ersten postoperativen Wochen bzw. bei akuten Abstoßungskomplikationen zu verabreichen. Ob und wie Cyclosporin A, ein stark immunsuppressiv wirkendes cyclisches Peptid, die oben erwähnten Medikamente in der Dauerbehandlung verdrängen kann, müssen die weiteren klinischen Studien zeigen, deren Aussichten aber sehr erfolgsversprechend sind.

Das angestrebte Ziel aller immunsuppressiven Therapien ist einerseits eine Reduzierung der gegen das Transplantat gerichteten immunologischen Reaktivität, andererseits sollten aber die Abwehrreaktionen gegen Bakterien, Viren und Pilze nicht wesentlich beeinflußt werden. Eine Möglichkeit dies zu erreichen könnte eine spe-

zifische Immunsuppression sein, bei welcher gezielt in die Immunregulation eingegriffen werden müßte, so zum Beispiel durch Induktion von antigenspezifischen Suppressorzellen (67) oder durch nicht komplementfixierende, sogenannte blockierende Antikörper. Auch die, im Tiermodell nachgewiesenen, antiidiotypischen Antikörper (68) sollten bei dem Problem der spezifischen Immunsuppression in Betracht gezogen werden. Diese könnten, basierend auf der Netzwerktheory des Immunsystems (69), regulierend oder durch Elimination von antigenreaktiven Clonen suppressiv wirken.

1.1 Problemstellung und Zielsetzung

Bei Lebertransplantationen ist das Transplantat nicht einer so starken Abstoßung unterworfen, wie dies bei Transplantationen anderer Organen der Fall ist (60,61,70). Diese "immunologische Begünstigung" der Leber kann ihre Ursache in einem unspezifischen immunsuppressiven Effekt lebereigener Faktoren (71,72) haben oder einer spezifischen Reduktion zellulärer Reaktionen (73), koordiniert eventuell durch Suppressorzellen.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich zum einen mit Suppressorzellaktivitäten bei leber- und nierentransplantierten Schweinen, zu anderen mit Suppressorzellaktivitäten im Humansystem. Für die Bestimmung der Suppressorzellaktivität sollte deshalb ein System bei Schwein und Mensch etabliert werden, das reproduzierbare Ergebnisse bringt, und den momentanen Vorstellungen bzw. Modellen der Induktion und Regulation der Immunantwort in Einklang stellt und evt. noch neue Daten zu einem besseren Verständnis dieser Mechanismen liefert. Bei lebertransplantierten Schweinen sollten die Suppressorzellaktivitäten über einen Zeitraum von vor bis einigen Wochen nach der Transplantation bestimmt werden, desgleichen auch die Aktivität von cytotoxischen T-Zellen. Weiter galt es beim Schwein zu untersuchen, wie sich nach Leber- und Nierentransplantationen die Suppressorzellaktivität in ver-

schiedenen Organen wie Blut, Milz, Lymphknoten und Leber verhält, um dadurch neue Erkenntnisse zur Ursache der "immunologischen Begünstigung" des Lebertransplantats zu erhalten.

Ein weiteres Aufgabengebiet stellten die Untersuchungen zu "Möglichkeiten der immunologischen Abstoßungsdiagnostik" bei nierentransplantierten Patienten dar. Das Ziel dieser Untersuchungen ist in einer Charakterisierung des immunologischen Reaktionszustandes der Patienten zu sehen, indem versucht wird, eine Aktivierung von donorspezifischen alloantigenreaktiven Zellen nachzuweisen und in Korrelation mit den jeweils angewendeten immunsuppressiven Therapien zu bringen. Bei nierentransplantierten Patienten, die mit drei verschiedenen Kombinationen von Immunsuppressiva therapiert wurden (1. LDS (low dose steroid) + Antithymozytenglobulin, 2. LDS + Cyclosporin A, 3. nur LDS), sollte die Fähigkeit zur Suppressorzellbildung und die spenderspezifische und unspezifische proliverative Reaktion in der gemischten Lymphozytenkultur getestet werden.

Weiter sollte die Tatsache, daß menschliche T-Lymphozyten spontan mit Schafserythrozyten Rosetten bilden (97), die Grundlage für die Erarbeitung eines reproduzierbaren Testes zur prospektiven Anwendung in der Erkennung von Abstoßungskrisen sein, indem an Hand der Rosettenbildung Subpopulationen der Blutlymphozyten betimmt werden (98, 99). Eine weitere Methode zur Subpopulationsanalyse mit Hilfe selbst radioaktiv markierter Antikörper sollte in diesem Zusammenhang auf Anwendbarkeit geprüft werden.

2. MATERIAL

2.1 VERSUCHSTIERE

Im Versuch wurden Schweine der Rasse "large white" gehalten. Für die Transplantationen wurden SLA-haploidentische Tiere verwendet. Die Tiere sind im Alter von acht bis zehn Wochen von der Zuchtanstalt St. Johann bezogen worden.

2.2 PATIENTENGUT

Für die Bestimmung der generierten Suppressorzellaktivität wurden Lymphozyten von 20 nierentransplantierten Patienten untersucht. Die Patienten wurden mit verschiedenen medikamentösen Kombinationen immunsupprimiert.

a) Low dose steroid-Therapie (LDS)

Intra-op	4-6mg/kg KG Azathioprin und	2000 mg Prednisolon
1.Tag post-op	3-4mg/kg KG	100 mg
2.	3-4mg/kg KG	80 mg
3.	3-4mg/kg KG	70 mg
4.	2,5-3mg/kg KG	60 mg
5.		60 mg
6.		55 mg
7.		55 mg

Im weiteren postoperativen Verlauf wurde die Prednisolon-Dosis schrittweise verringert. Bei akuten Abstoßungsreaktionen wurden 3 mal 1Gramm Prednisolon verabreicht.

b) LDS mit Antithymozytenglobulin (ATG)

Intra-op	5000mg ATG u.4-6mg/kg KG Azath. u.	2x1000mg Prednis.
1.Tag post-op	50mg/kg KG 3-4mg/kg KG	30mg
ab 2.Woche	30mg/kg KG	30mg

ab 3.Woche	25mg/kg KG ATG	25mg Prednis.
ab 4.Woche		20mg

Bei akuten Abstoßungsreaktionen innerhalb der 2.-3. Woche drei bis fünfmal 1 Gramm Prednisolon, innerhalb der 6. Woche bis zum 3. Monat zusätzlich 50-30mg/kg KG ATG für 3 Tage.

c) LDS mit Cyclosporin A

6 h prä-op	15 mg/kg KG Cs-A	
Intra-op		250 mg Prednisolon
6 h post-op		250 mg
1.Tag post-op	15 mg/kg KG	100 mg

Bis zum 6. Tag post-op wird die Prednisolon-Dosis auf 40 mg erniedrigt, die Cs-A Gabe bleibt in gleicher Höhe bis zum 14.Tag. Prednisolon erniedrigt sich vom 7. bis 14. Tag post-op auf 30mg. Im weiteren Verlauf erniedrigt sich die Cs-A Dosis vom 15.-30.Tag auf 12,5 mg/kg KG und Prednisolon auf 20 mg.

Lymphozyten von 13 weiteren nierentransplantierten Patienten wurden mit den Methoden der E-Rosettierung untersucht. Als Kontrolle für diese Untersuchungen fanden Lymphozyten von vier Normalpersonen Verwendung.

2.3 MEDIEN

2.3.1 WASCHMEDIEN

RPMI 1640, Gibco Bio-kult
Mc Coy Seromed
PBS(Dulbecco) Seromed

2.3.2 KULTURMEDIEN

Kulturmedium A: RPMI 1640 + 25 mM Hepes + L-Glutamin ($2x10^{-3}M$) +

1 ml Gentamycin (50 mg) + 10% autologes Humanserum (56°C inaktiviert)

Kulturmedium B:
Mc Coy + L-Glutamin ($2x10^{-3}M$) + 1 ml Gentamycin (50 mg) + $0,5x10^{-5}M$ Mercaptoethanol + 10% autologes Schweineserum (56°C inaktiviert)

2.3.3 Einfriermedien

RPMI 1640 + 25 mM Hepes + L-Glutamin ($2x10^{-3}M$) + 1 ml Gentamycin (50 mg) + 20% Fötales Kälberserum + 10% Dimethylsulfoxid

Mc Coy + L-Glutamin ($2x10^{-3}M$) + 1 ml Gentamycin (50 mg) + $0,5x10^{-5}M$ Mercatoethanol + 20% FCS + 10% DMSO

2.4 Antiseren

Anti-β_2-Mikroglobulin vom Kaninchen, Biotest
OKT-3, Ortho-Pharma
Antithymozytenglobulin, Fresenius
FITC-konjugiertes Ziegen-anti-Kaninchen Ig, Hyland
Anti-human Ig vom Kaninchen, DAKO

2.5 Andere Materialien und Reagenzien

Hammelblut, Behring
Hammelblut, Seuffer
Hammelblut aus eigener Tierhaltung
Fötales Kälberserum (FCS), Paesel
L-Glutamin, Seromed
Gentamycin, Serva
Thrompophrob, Nordmark
Lymphophrep, Nyegaard & Co

Komplement vom Kaninchen, Biotest
^{3}H-Thymidin, 1 mCi/ml, spez. Akt. 2 Ci/mM, NEN
$Na_2{}^{51}CrO_4$, 1 mCi/ml, spez. Akt. 300-400 mCi/mg, NEN
$Na\,{}^{125}J$, 1mCi/ml, Spez. Akt. 15 mCi/µg, NEN
Scintillationsflüssigkeit, Zinsser
Phytohämagglutin, DIFCO
Concanavalin A, Serva
Streptomycetenextrakt, freundlicherweise von W. Bessler, Uni Tübingen,zur Verfügung gestellt.
Trypanblau, Flow Lab.
Mercaptoethanol, Merck
Dimethylsulfoxid, Merck
Formalin, Merck
Natriumazid, Merck
Paraffinöl, Merck
Eosin-yellow, Merck
Glycerin für Fluoreszenzmikroskopie, Serva
Eukitt, Kindler
Filterrondellen, Dynatech

2.6 GERÄTE

Diavert (Invertmikroskop), Leitz
Lichtmikroskop, Leitz
Fluoreszenzmikroskop, Leitz
Minifuge, Heraeus-Christ
Tischzentrifuge, Beckmann
Steriler Arbeitstisch mit Abflammgerät, CEAG
Beta-Counter, Nuclear-Chicago
Gamma-Counter, Strahlentechnik
Wärmeschrank, Forma Scientific
Zellerntegerät, Dynatech
Sterilisator, Küster

Stickstofftank, 200 l, Cryoson
Metallsiebe, Maschenweiten: 0,05; 0,1; 0,4; 0,8 mm, Retsch
Terasaki-Platten, Greiner
Mikrotiterplatten, U-Form, Flow. Lab.
Makrotiterplatten, Falcon
Kulturflaschen, 50 ml, NUNC

3. Methoden

3.1 Zellisolierung

3.1.1 Isolierung von Lymphozyten aus peripherem Blut

Peripheres Human- oder Schweineblut (1% Heparin) wurde mit Kulturmedium A bzw. Kulturmedium B 1:2 verdünnt und auf einen Ficoll-Hypaque Gradienten (Dichte 1,077 g/cm³) aufgetragen. Nach Zentrifugation mit 800 x g für 25 Minuten sind die Lymphozyten von den Erythrozyten getrennt und werden mit einer Pipette abgehoben. Um störende Ficoll- oder Heparinreste zu beseitigen, wird anschließend zweimal mit 800 x g für zehn Minuten gewaschen (74).

3.1.2 Isolierung von Lymphozyten aus humaner Milz

Die Milzen stammten von Leichen-Nierenspendern, deren Nieren Patienten des hiesigen Transplantationszentrums implantiert wurden. Die Aufarbeitung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Zunächst wurde die Milz mit einer Schere zerkleinert, und dann, unter permanentem Nachspülen mit RPMI-Medium, durch Metallsiebe mit der Maschenweite 0,1mm bzw. 0,05mm gedrückt. Die erhaltenene Suspension wird zehn Minuten bei 600 x g zentrifugiert, das aufgenommene Pellet durch Gaze filtriert und die Zellzahl bestimmt. Die noch vorhandenen Erythrozyten störten nicht, da sie bei dem anschließenden Einfriervorgang weitgehend zerstört wurden.

3.1.3 Isolierung von Lymphozyten aus Schweinemilz

Der Isolierungsvorgang bis zu der Zellsuspension geschah analog 3.1.2, außer daß Mc Coy-Medium benützt wurde. Da die Schweinelymphozyten im Gegensatz zu den Humanlymphozyten frisch in den Testen eingesetzt wurden, mußten die sonst störenden Erythrozyten

mittels Ficoll-Hypaque-Gradientenzentrifugation wie unter 3.1.1 beschrieben entfernt werden.

3.1.4 Lymphozytenpräparation aus Schweineleber

Die Isolierung der in der Leber vermuteten Lymphozyten wurde mit einfachen Methoden bewerkstelligt. Dazu wurde etwa die halbe Leber mit der Schere in Stücke zerkleinert und hintereinander durch Metallsiebe mit den Maschenweiten 0,8mm, 0,4mm, 0,1mm und 0,05mm passiert. Die Passage muß laufend durch Spülung mit Mc Coy-Medium unterstüzt werden. Die erhaltene Suspension wurde auf Ficoll-Hypaque-Gradienten aufgetragen und 25 Minuten bei 800 x g zentrifugiert. Die nach der Zentrifugation isolierte Lymphozytenfraktion wurde ein zweitesmal auf Ficoll-Hypaque aufgetragen und nochmals 25 Minuten bei 800 x g zentrifugiert um eine saubere Abtrennung der Lymphozyten von den übrigen Leberbestandteilen zu gewährleisten. Lösliche Faktoren des Leberhomogenates sind durch drei aufeinanderfolgende zehnminütige Waschgänge bei 600 x g entfernt worden.

3.1.5 Abtrennung von Makrophagen und Monozyten durch Adhärenz

Eine Lymphozytensuspension von 50 - 100x10^6 Zellen in 15 ml Kulturmedium A + 40% Serum oder Plasma werden in eine Petrischale (Ø 10 cm) oder in eine Zellkulturflasche (250 ml) gegeben und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Überstand abgehoben und die Petrischale bzw. Zellkulturflasche dreimal gewaschen. Die Makrophagen und Monozyten adherieren an der Plastikoberfläche, die B- und T-Lymphozyten sind im Überstand (75)

3.2 Einfrieren und Auftauen von Lymphozyten

Um zeitlich versetzte Untersuchungen mit gleichem Zellmaterial ausführen zu können, mußten humane Milzzellen und Lymphozyten aus Schweineblut eingefroren werden. Die isolierten Zellsuspensionen wurden jeweils auf 40 - 50x10^6 Zellen/ml in RPMI + 20% Fötales Kälberserum bzw. Mc Coy + 20% Fötales Kälberserum (FCS) eingestellt und im Eisbad gekühlt. Eine ebenfalls eiskalte Lösung aus 20% Dimethylsulfoxid (DMSO), 20% FCS und 60% RPMI bzw. Mc Coy-Medium wurde dann mit der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 gemischt, die Mischung sofort in vorgekühlte 2 ml Einfrierröhrchen aliquotiert und in einer Styroporbox (76) bei -80°C eingefroren. Ca. 24 Stunden später mußten die Röhrchen in Tanks mit flüssigem Stickstoff umgelagert werden. Beim Auftauen wurden die Röhrchen unter fließend kaltes Wasser gehalten und die Zellen noch in halbgefrorenem Zustand in eiskaltes Waschmedium gegeben. Nach zwei Waschgängen (600 x g, 10 Minuten) konnten die Zellen für entsprechende Teste verwendet werden (77).

3.3 Trennung von T- und B-Lymphozyten

Für die Isolierung von T-Lymphozyten aus einer Zellsuspension wurde Nylonwolle verwandt, die die Eigenschaft hat, B-Lymphozyten und Makrophagen zu binden (78,79). Eine 10 ml Plastikspritze wurde mit 0,6 Gramm Nylonwolle so gefüllt, daß das Volumen der Spritze bis zur 6 ml-Marke ausgefüllt war. Da bei späteren Testen Sterilität gefordert war, wurde die Spritze und der Kolben vor Gebrauch mit Heißdampf sterilisiert. Vor dem Auftragen der Zellsuspension muß die Spitze einmal mit 40 ml RPMI-Medium und 40 ml RPMI + 5% FCS vorgespült werden. Dabei ist zu beachten, daß alle eingeschlossene Luft in der Nylonwolle entfernt wird. Die mit RPMI + 5% FCS gefüllte und am Auslauf mit Schlauch und Klemme verschlossene Spritze wird dann bei 37°C für eine Stunde inkubiert und anschließend werden maximal zwei Milliliter Zellsuspension(zwischen 5 bis 10x10^7 Zellen) auf die Nylonwolle aufgetragen. Die Spritze

mit den in die Nylonwolle eingesickerten Zellen muß danach eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert werden. Das Eluieren erfolgt mit 37°C warmem RPMI + 5% FCS. Die Fraktion mit den ersten 20 ml enthält die T-Zellen, das folgende Eluat von 100 ml wird verworfen. Um die B-Zellen zu entfernen, wird die Spritze mit dem Kolben ausgedrückt. Nach Auffüllen der Spritze mit Waschmedium und Aufwühlen der Nylonwolle mit einer sterilen Pinzette wird dieser Ausdrückvorgang noch dreimal wiederholt. In der erhaltenen Fraktion sind B-Zellen und Makrophagen. Um evt. Verunreinigungen zu entfernen, werden die Zellen noch zweimal gewaschen (600xg, zehn Minuten).

3.4 Methoden zur Hemmung der Zellteilung und der Translation

3.4.1 Mitomycin C - Behandlung

Mitomycin C hemmt die Mitose und wurde zur Unterdrückung der Zellproliferation verwendet. Die Lymphozyten wurden auf ca. $8\text{-}10 \times 10^6$ Zellen/ml konzentriert. Pro ml Zellsuspension werden 25 µg Mitomycin C benötigt. Die anschließende Inkubation für 30 Minuten erfolgte bei 37°C und 5% CO_2 im Wärmeschrank. Durch dreimaliges Waschen (800xg für 10 Minuten) wurde überschüssiges Mitomycin C entfernt (80).

3.4.2 Bestrahlung

Die Lymphozyten waren im Kulturmedium auf eine Konzentration von $2 - 4 \times 10^6$/ml eingestellt und mit Röntgenstrahlen im Abstand von 82 cm und einer Dosis von 20 gray (2000 rad) für 2 Minuten bestrahlt worden (80).

3.5 Komplementinaktivierung im Serum

Bei den zellulären Testen wurde immer 10% autologes Serum zum jeweiligen Medium zugesetzt. Das im Serum lokalisierte Komplementsystem könnte sich dabei negativ auf die Kulturbedingungen auswirken. Aus diesem Grund wird das gewonnene Serum 30 Minuten bei 56°C inkubiert und 15 Minuten mit 3000 rpm(2000xg) zentrifugiert. Der Überstand wird als Medienzusatz genommen.

3.6 Zelluläre Teste

3.6.1 Gemischte Lymphozytenkultur (MLC)

Die gemischte Lymphozytenkultur stellt ein in vitro Analogon einer zellulären Immunreaktion dar (81,82). Es werden Lymphozyten zweier Personen, die sich in den Histokompatibilitätsantigenen unterscheiden, miteinander inkubiert, wobei die Lymphozyten der einen Person als Stimulator, die der anderen als Responder fungieren. Die Stimulatorzellen wurden zuvor durch Mitomycin C-Behandlung oder Bestrahlung in ihrer Zellteilung gehemmt. Die Konzentration von Stimulator- und Responderzellen betrug je $1x10^6$/ml Kulturmedium A bzw. B mit Schweinelymphozyten. Je 100 µl wurden in eine Vertiefung von Mikrotiterplatten gegeben und für sieben Tage bei 37°C mit 5% CO_2 inkubiert. Mitte des sechsten Tages erfolgte die Zugabe (bei MLC mit Schweinelymphozyten mitte des fünften Tages) von 10 µl ^{3}H-Thymidin (0,5 µCi). Nach 18 Stunden wurden die Kulturen über Filterrondellen abgesaugt, die Filter getrocknet und mit 2 ml Scintillationsflüssigkeit im ß-Counter für 2 Minuten gezählt.

Für den Makroansatz der MLC galten dieselben Kulturbedingungen, nur wurden dabei mehr Zellen in größerem Volumen (3 bis 20 ml) in Makrotiterplatten oder 50 ml Zellkulturflaschen inkubiert. Die Zellkonzentration blieb aber gleich der im Mikrotiterplattenansatz.

3.6.2 Autologe Humane gemischte Lymphozytenkultur

Bei dieser Methode fanden die durch Nylonwolle getrennten T- und B-Lymphozytenfraktionen Verwendung. Im Gegensatz zur herkömmlichen gemischten Lymphozytenkultur stammen hier sowohl Responder- als auch Stimulatorzellen von demselben Individuum (83,84,85). Die Zellen der B-Zellfraktion wurden entweder durch Bestrahlung oder Mitomycineinbau (s. 3.4.1 und 3.4.2) in ihrer Proliferationsfähigkeit gehemmt und nach Beendigung der jeweiligen Verfahren auf eine Zelldichte von $1x10^6$/ml in Kulturmedium A eingestellt. Auf dieselbe Zellkonzentration mußte die T-Zellfraktion gebracht werden. Zur Testausführung wurden je 100 µl der beiden Fraktionen in die Vertiefungen einer Rundboden-Mikrotiterplatte gegeben. Die Platte inkubierte dann sechs Tage bei 37°C unter 5%iger CO_2-Begasung. Achtzehn Stunden vor Beendigung der Inkubation wurde pro Vertiefung 10 µl ^{3}H-Tymidin mit der Aktivität von 0,33 µCi gegeben. Zur Bestimmung des ^{3}H-Thymidineinbaus in die proliferierenden Zellen sind die Testansätze mit Hilfe eines Zellerntegerätes über Filder abgesaugt, die Filter bei ca. 80°C getrocknet und mit je zwei Milliliter Scintillationsflüssigkeit versetzt worden. Der Einbau (cpm) wurde im ß-Counter bestimmt.

3.6.3 Suppressor-Test mit Zellen aus MLC-Kulturen

Dieser Test sollte eine reproduzierbare Aussage über die Suppressorimierungsaktivität von differenzierten Lymphozyten erbringen, welche vorher in einer gemischten Lymphozytenkultur gehalten worden waren (86,87). Die MLC, ich bezeichne sie im folgenden als Differenzierungs-MLC, (SR)', wurde wie unter 3.6.1 beschrieben angesetzt und zwischen zwei bis vierzehn Tage unter den bekannten Bedingungen inkubiert. Nach vorsichtiger Entnahme aus den Zellkulturflachen bzw. Makrotiterplatten werden die Zellen bei 200xg für zehn Minuten abzentrifugiert, danach der Überstand abgenommen und aufbewahrt. Es schließen sich zwei weitere, unter gleichen Bedingungen ausgeführte

Waschgänge der Zellen an, um sie dann auf eine Zellzahl von $1x10^6$/ ml Kulturmedium A einzustellen. Die Suppressoraktivität der so erhaltenen Zellen wird nun in einer sogenannten Test-MLC überprüft. Dafür werden frisch isolierte Stimulator- bzw. Responderzellen, SmR, verwendet sowie die in der Differenzierungs-MLC erhaltenen Zellen, die, bestrahlt und unbestrahlt, in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt werden. Sollte eine Suppressoraktivität vorhanden sein, drückt sich dies in einem geringeren ^{3}H-Thymidineinbau der Test-MLC (im Verhältnis zur Kontrolle)nach 6 Tagen aus. Die frischen Stimulator- und Responderzellen wurden isoliert und die Stimulatorzellen bestrahlt oder durch Mitomycin in ihrer Proliferationsfähigkeit gehemmt und je 80 µl der eingestellten Suspension in eine Vertiefung von U-Mikrotiterplatten gegeben. Von den Zellen der Differenzierungs-MLC wurden in verschiedenen Ansätzen 80, 40, 20 bzw. 10 µl zugegeben, so daß sich jeweils ein Zellverhältnis von frisch isolierten Zellen zu Zellen der Differenzierungs-MLC von 2:1, 4:1, 8:1 und 16:1 ergab. Die Feststellung der Suppressoraktivität der Überstände erfolgte in gleicher Weise, nämlich durch Zugabe von 80, 40, 20, bzw. 10 µl. Die anschließende Inkubation und Markierung mit ^{3}H-Thymidin ist dann wie unter 3.6.1 beschrieben ausgeführt worden. Für die Auswertung wurde die Prozentuale Suppression wie folgt berechnet:

$$\% \text{ Suppression} = \left(1 - \frac{\text{cpm von SmR + (SR)'}}{\text{cpm von SmR}} \right) \times 100$$

3.6.4 Suppressor-Test mit frisch isolierten Lymphozyten

Bei den Untersuchungen der Suppressoraktivität von Zellen die aus Organen von transplantierten Schweinen stammen, mußte das Testsystem 3.6.3 verifiziert werden, da die Tiere bei der Organentnahme getötet wurden und deshalb zu späterem Zeitpunkt keine frischen Zellen mehr vorhanden sind. Eingesetzt wurden isolierte Zellen aus peripherem Blut, Milz, Lymphknoten und der Leber ($1x10^6$/ml) in verschiedenen Stimulator-Responder Kombinationen, wobei die Stimulator-

zellen in ihrer Zellteilungsfähigkeit gehemmt waren. Zu je 80 µl Stimulator- bzw. Responderzellen pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte kamen wiederum je 80, 40, 20 bzw. 10 µl der Zellpopulation, die auf Suppressoraktivität zu untersuchen war. Damit nicht zusätzliche Proliferation, sondern wirklich nur evt. vorhandene Suppressoraktivität gemessen werden konnte, mußten diese Zellen bestrahlt oder mit Mitomycin C behandelt werden. Die Mikrotiterplatten wurden fünf Tage bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert, wobei achtzehn Stunden vor Inkubationsende 10 µl ^{3}H-Thymidin pro Vertiefung zugegeben wurde. Ansonsten geschah die Bestimmung des ^{3}H-Einbaus in cpm wie unter 3.6.1 beschrieben.

3.6.5 Cell-mediated Lympholysis (CML)

Mit dieser Methode (88-90, 86) wird die Fähigkeit der bei der gemischten Lymphozytenkultur gebildeten cytotoxischen T-Lymphozyten (Tc) nachgewiesen, andere Zellen, sogenannte Targetzellen, durch Wiedererkennung der Histokompatibilitätsantigene zu lysieren.

3.6.5.1 MLC-Ansatz

Der Ansatz der gemischten Lymphozytenkultur erfolgte in Zellkulturflaschen wie unter 3.6.1 beschrieben.

3.6.5.2 Isolierung der cytotoxischen T-Lymphozyten

Am siebten Kulturtag erfolgte die Gewinnung der Tc. Zu diesem Zeitpunkt ist die Proliferation in der MLC am größten. Die gebildeten Zellen wurden einmal bei 600xg für zehn Minuten gewaschen und auf die Konzentration von $10x10^6$/ml Kulturmedium B gebracht.

3.6.5.3 Behandlung der Targetzellen

Als Targetzellen dienten Lymphozyten der ursprünglichen Stimulator- und Respondertypen, sowie Lymphozyten eines dritten Phänotyps als Kontrolle. Die Targetzellen wurden frisch isoliert und für den ^{51}Cr-

Einbau auf $0,5x10^6$in 0,1 ml Kulturmedium B konzentriert. Nach der Zugabe von 100 µl $Na_2{}^{51}CrCO_4$ (100 µCi) werden die Zellen für 90 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend wurden drei Waschgänge (600xg für 10 Minuten) für die Entfernung des überschüssigen Cr durchgeführt. Für den CML-Ansatz wurde eine Konzentration von $0,5x10^6$ Zellen/ml Kulturmedium B der markierten Targetzellen benötigt.

3.6.5.4 Bestimmung des Spontanrelease

Um den Spontanrelease bestimmen zu können, wurden unmarkierte Lymphozyten jener Zelltypen, die als Targetzellen Verwendung fanden, in einer Konzentration von $10x10^6$/ml Kulturmedium B gebraucht(Diese Zellen wurden anstelle der Tc eingesetzt, um in allen Tests dieselbe Zellkonzentration, also gleiche Bedingungen, zu gewährleisten).

3.6.5.5 Ansatz der CML

Der Test erfolgte in U-förmigen Mikrotiterplatten. Pipettiert wurden jeweils 100 µl Tc bzw. unmarkierte Lymphozyten (je $1x10^6$Zellen) zu 100 µl Targetzellen ($1x10^4$ Zellen). Danach wurden die Mikrotiterplatten mit 200xg für fünf Minuten zentrifugiert, um einen guten Zellkontakt zu gewährleisten und anchließend bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach einer sechsstündigen Inkubation erfolgte erneut eine Zentrifugation mit 600xg für zehn Minuten.
Von jedem Ansatz wurden 100 µl in Polyethylenröhrchen (1ml) gefüllt und die Röhrchen mit flüssigem Wachs verschlossen. Zur Bestimmung des maximalen ^{51}Cr-Einbaus wurden jene Ansätze resuspendiert und auch in Polyethylenröhrchen gefüllt, die unmarkierte Lymphozyten und Targetzellen enthielten. Von allen Proben wurden im Gamma-Counter die cpm bestimmt.
Die prozentuale Lyse wurde nach "specific standardized release"(SSR) berechnet:

$$SSR = \frac{2 \times (A - B)}{C + B} \quad \text{mit}$$

A = cpm vom Testansatz, B= cpm vom Spontanrelease und C= cpm vom maximalen Einbau.

3.6.6 Lymphozytenstimulation

Die isolierten Lymphozyten wurden auf $1x10^6$ Zellen/ml Kulturmedium konzentriert. Jeweils 200 µl dieser Zellsuspension wurde in die Vertiefungen einer Rundbodenmikrotiterplatte gegeben. Von den auf mitogene Aktivität zu testende Substanzen wurden jeweils 20 µl der verschiedenen Verdünnungen dazu pipettiert und bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Achtzehn Stunden vor Ende der Inkubationszeit wurde mit Zugabe von 10 µl ^{3}H-Thymidin die Proliferationsrate festgestellt. Mit dem Zellerntegerät wurden danach die Kulturen über Filter abgesaugt, die Filter getrocknet und mit zwei Milliliter Scintillationsflüssigkeit versetzt und im ß-Counter die cpm bestimmt.

3.7 Serologische Teste

3.7.1 Indirekte Immunfluoreszenz (IFL)

Für diese Technik(91) werden pro Ansatz $1,5x10^6$ Lymphozyten (in PBS + 0,02% NaN_3) benötigt, die in 1,5 ml Eppendorfmikroreagenzgefäße gefüllt wurden. Nach Zentrifugation mit 600xg für zehn Minuten und Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mit 50 µl Antiserum resuspendiert. Dann erfolgte für 20 Minuten eine Inkubation bei Raumtemperatur. Die ungebundenen Antikörper wurden in einem anschließenden Waschgang (600xg, 10 Minuten in PBS + 0,02% NaN_3) entfernt. Die Aufnahme des Pellets geschah mit spezifischem FITC-konjugiertem Antiserum, das gegen die erst eingesetzten Antikörper gerichtet war. Es wurde wieder für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, danach zweimal sorgfältig w.o. gewaschen und zum Schluß das Pellet in 5 µl Glycerin/Glycin aufgenommen und auf einem Objektträger mit Eukitt eingedeckt. Die Auswertung erfolgte unter einem Fluoreszenzensmikroskop.

3.7.2 Complementabhängiger Cytotoxizitätstest (CTX)

Um zu einer schnellen qualitativen Aussage über Antikörperbindung an Zellen zu kommen, wird der CTX (92) häufig, auch in den Routinelabors, angewandt.
Ausgeführt wird der Test in Terasaki-Platten. Im ersten Schritt werden 1 µl Antiserum und 1 µl Lymphozytensuspension von $2x10^6$Zellen/ml PBS für 30 Minuten unter Öl inkubiert (alle Arbeitsgänge bei Raumtemperatur). Danach erfolgte eine Zugabe von 5 µl Komplement, das für 100 Minuten einwirkte. Um die Zellyse sichtbar zu machen, wurden 5 µl einer 0,5%igen Eosinlösung zugegeben, um nach fünf Minuten diesen Zustand in 5 µl filtriertem Formalin zu fixieren.
Nach mindestens drei Stunden konnte die Auswertung bei 20-facher Vergrößerung mit einem Phasenkontrastmikroskop erfolgen. Die angefärbten, toten Zellen wurden prozentual zu den nicht angefärbten, lebenden Zellen nach folgendem Schlüssel angegeben:

% Lyse	Bewertungsnote
0 - 15	0
16 - 25	1
26 - 35	2
36 - 50	3
51 - 80	4
81 -100	5

3.7.3 Agar-Immundiffusion (Ochterlony)

Dieser Test beruht auf Immundiffusion und -präzipitation in einem Agarose-Gel (93). Er wurde zur Überprüfung der Immunglobulinmarkierungen angewendet. Ein Gramm Agarose wurde mit 100 ml PBS unter Rühren erwärmt, bis sich eine klare Lösung einstellte. Vier Milliliter dieser Agarose-Lösung sind in eine Petrischale (Ø 4 cm) gegossen worden. Nach Erkalten bzw. Ausbildung des Agarose-Gels, wurde nach einem festgelegten Muster Löcher gestanzt, die man mit Antigen und Antiserum so füllte (je 25 µl), daß beide aufeinander zu

diffundierten. Wenn das Antiserum gegen das relevante Antigen gerichtet war, führte dies zu einer sichtbaren Präzipitationsbande.

3.8 Radioaktive Markierungen von Antikörpern

3.8.1 Markierung mit Tritium

Der Vorteil der Tritiummarkierung besteht darin, daß die Halbwertszeit des Isotops sehr groß ist und deshalb eine einmal markierte Antikörpercharge lange für Testansätze herangezogen werden kann, ohne daß die Reproduzierbarkeit darunter leidet. Die Antikörper wurden mit käuflichem N-Succinimidyl-(2,3,^{3}H)-propionat (NS^{3}HP) zur Bindung gebracht (94). Freie Aminogruppen der Proteinmoleküle (z.B. Lysin) reagieren mit der ^{3}H-markierten Gruppe des Propionats, so daß eine Amidbindung entsteht. Diese Markierungsmethode ist eine Abwandlung der Bolton-Hunter Methode (95), mit der sich ^{125}Jod-Markierungen durchführen lassen. Die Reaktionsbedingungen sollten so gewählt werden, daß ca. 3 Mol Ester zu einem Mol Protein eingesetzt werden. Dazu wurden 2,5 nM NS^{3}HP, das in Toluol gelöst war, zuerst im Stickstoffstrom getrocknet. Danach 0,75 nM des Antikörpers, der in 0,1 M Boratpuffer gelöst war, zugegeben und 20 Minuten im Eisbad inkubiert. Direkt anschließend erfolgte eine Zugabe von 300 µl 0,4 M Glycin(in 0,1 M Boratpuffer) und eine weitere Inkubation im Eisbad für zehn Minuten. Das Glycin verhindert eine Konjugation des nicht gekoppelten Esters. Mittels Gelfiltration an Sephadex G-50 wurde das ^{3}H-markierte Protein von den anderen Reaktionspartnern getrennt.

3.8.2 Markierung mit Jod-125

Zur Radiojodierung der Antikörper wurden käufliche Jodierungssäulen verwendet. Darin reagiert das an eine poröse Fiberglasplat-

te gebundene Chloroglycoluril(1,2,4,6-Terrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril) mit den Antikörpern und den ^{125}Jod-Ionen, die beide in wäßriger Lösung vorliegen. Der Reaktionsvorgang ist ähnlich dem der Chloramin T-Methode (96): Das oxidierende Chloroglycoluril katalysiert die elektrophile Substitution des ^{125}Jod an Tyrosin-Reste des Proteins.

Die Säule ist im unteren Teil mit Sephadex G-25 und einem Ionenaustauscherharz gefüllt. Über dem Harz liegt die mit Chloroglycoluril gebundene Fiberglasplatte. Der Säulenauslauf ist mit einem Stopfen verschlossen. Bei Entfernung des Stopfens eluiert die Säule bis die Flüssigkeit die Fiberglasplatte erreicht: Dadurch wird das eluierte Fraktionsvolumen gleich groß dem aufgetragenen Volumen. Das Reaktionsgemisch, bestehend aus 100 µl Antikörper(2,5 mg/ml in 0,1 M Boratpuffer), 60 µl PBS und 10 µl Na^{125}J(0,5 mCi), wird auf die Fiberglasplatte aufgetragen, sechs Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit PBS in 0,5 ml-Fraktionen eluiert. Von 10 µl jeder Fraktion wurde die Gamma-Aktivität in cpm bestimmt.

3.9 Radioimmunoassay (RIA)

3.9.1 RIA mit isolierten Lymphozyten

Fünfzig Mikroliter der markierten Antikörperlösung wurden mit 5000, 10000, 50 000 oder 100 000 Zellen(in jeweils 50 µl PBS) für 1,5 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Antikörperkonzentration muß dabei so gewählt werden, daß alle vorhandenen antigenen Determinanten der Zelloberfläche abgedeckt werden können. Bei Annahme von 10^5 Determinanten pro Zelle lag im Ansatz mit 100 000 Zellen noch ein 100-facher Antikörperüberschuß vor. Drei Waschgänge(600xg, 10 Minuten) sorgten nach Beendigung der Inkubation für Entfernung der nicht gebundenen Immunglobuline. Nach dem letzten Waschgang wurden die Zellen in 100 µl PBS resuspendiert und die Gamma-Aktivität bzw. mit Scintillationsflüssigkeit die ß-Aktivität in cpm bestimmt.

3.9.2 RIA mit Vollblut

Anstelle der Lymphozytensuspension wurde mit Vollblut gearbeitet. Fünf, zehn, fünfzig oder hundert Mikroliter Vollblut sind dabei mit 50 µl markierter Antikörperlösung versetzt worden. Die weiteren Arbeitsschritte geschahen analog 3.9.1.

3.10 E-Rosetten mit Schafserythrozyten (SRBC-Rosetten) (97)

3.10.1 Herstellen der Schafserythrozytensuspension

Mit einer Spritze wurden Schafen aus der Vena jugularis externa zehn ml Blut(in 0,1% Heparin) abgenommen. Durch dreimaliges Waschen bei 600xg für zehn Minuten wurden alle Serumbestandteile entfernt. Nach dem letzten Waschgang wurden eine 0,5-, 1,25- und 3,75%ige Erythrozytensuspension in PBS hergestellt. Mit dem käuflich erworbenen Schafsblut wurde genauso verfahren.

3.10.2 Bestimmung der aktiv rosettierenden Zellen (A-RFC) (98)

Isolierte Humanlymphozyten wurden auf $2x10^6$/ml PBS konzentriert, 125 µl dieser Suspension mit 125 µl einer 0,5%igen Schafserythrozytensuspension in Reagenzgläschen versetzt und sofort anschliessend mit 200xg für 5 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der halbe Überstand entfernt, bevor die Schafserythrozyten in Suspension gebracht werden(dieser Konzentrierungsschritt erleichtert das Auszählen der Rosetten unter dem Mikroskop). Bei der Auswertung wurden 500 - 600 Zellen gezählt und das Ergebnis in folgender Weise angegeben:

$$\frac{\text{Anzahl rosettierender Zellen}}{\text{Gesamtzahl der Lymphozyten}} \times 100$$

3.10.3 Bestimmung der hoch-affinen rosettierenden Zellen (H-RFC) (99)

Fünfzig Mikroliter Humanlymphozytensuspension ($2x10^6$/ml PBS wurden mit 100 µl Fötalem Kälberserum und 100 µl 1,25%iger Schafserythrozytensuspension für fünf Minuten bei 37°C inkubiert, danach kurz zentrifugiert (5 Minuten, 200xg). In gepacktem Zustand wurden die Zellen bei 29°C über Nacht inkubiert und nach Resuspendierung die relative Rosettenzahl unter dem Mikroskop bestimmt. Die Berechnung erfolgte nach der oben beschriebenen Formel.

3.10.4 Bestimmung der nieder-affinen rosettierenden Zellen (L-RFC) (99)

Diese Rosettenart wird rein numerisch durch Subtraktion der H-RFC von den total rosettierenden Zellen (3.10.5) bestimmt.

3.10.5 Bestimmung der gesamt rosettierenden Lymphozyten (T-RFC) (98)

Der Lymphozytentiter betrug bei diesem Test $4x10^6$/ml PBS. Davon wurden 50 µl mit 100 µl FCS und 100 µl einer 3,75%igen Schafserythrozytensuspension 15 Minuten bei 37°C inkubiert, danach 5 Minuten mit 200xg zentrifugiert und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Am Morgen des nächsten Tages wurden die rosettierenden Zellen bestimmt.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zum Suppressor-Testsystem

Für alle methodischen Untersuchungen ist es von großer Wichtigkeit, ein geeignetes Testsystem zur Verfügung zu haben, vor allem, wenn Fragestellungen aus der Humanmedizin vorliegen. Hier erweist sich das Tiermodell immer noch als notwendige Prämisse, um Übertragungen und damit Aussagen zu Humanproblemen zu gestatten. Die Schweine-Organtransplantation ist ein solches Tiermodell, welches operativ etabliert ist und sich auch gut für immunologische Experimente eignet.

Im folgenden sollte versucht werden, Erkenntnisse über den Immunstatus bezüglich der Bildung von Suppressorzellen bei leber-, nieren- und hauttransplantierten Schweinen zu erhalten, um diese Erfahrungen bei nierentransplantierten Patienten anzuwenden. Die benützte Methode des Suppressorzellnachweises mußte zuerst reproduzierfähig etabliert werden.

4.1.1 Suppressorzellnachweis in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC)

Für eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der Bildung von Supprimierungsaktivität in der MLC, wurden die Zellen einer gemischten Lymphozytenkultur, die ich im folgenden Differenzierungs-MLC nennen werde, nach 2, 4, 7, 11 und 14 Tagen in eine frisch angesetzte MLC eingesetzt, die im folgenden als Test-MLC bezeichnet wird (Abb. 2).

Abbildung 3 zeigt das Ergebnis: Die größte Proliferationshemmung der Test-MLC ergab sich bei Einsatz von Zellen einer 7-Tage-Differenzierungs-MLC. Es war auch kaum ein Unterschied festzustellen, wenn das Zellverhältnis von Diff.-MLC zu den frisch isolierten Zellen in der Test-MLC von 1:2 bis 1:32 verändert wird, im Gegen-

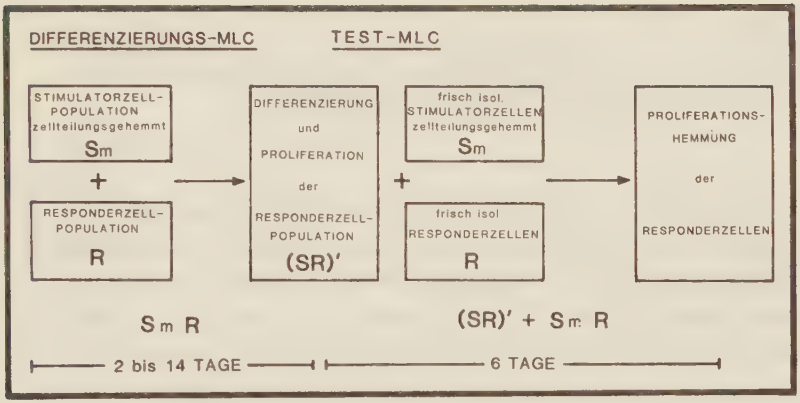

ABBILDUNG 2 Testverlauf zur Herstellung und Aktivitätsbestimmung von Suppressorzellen. In einer Differenzierungs-MLC werden mitomycinbehandelte oder gammabestrahlte Stimulatorzellen Sm und Responderzellen R für zwei bis vierzehn Tage kultiviert. Diese kultivierte Lymphozytenpopulation (SR)' wird danach mit frisch isolierten Stimulatorzellen und Responderzellen Sm + R in verschiedenen Zellkonzentrationen in der Test-MLC für sechs Tage kultiviert und mittels ^{3}H-Thymidineinbau die Proliferationsrate bestimmt.

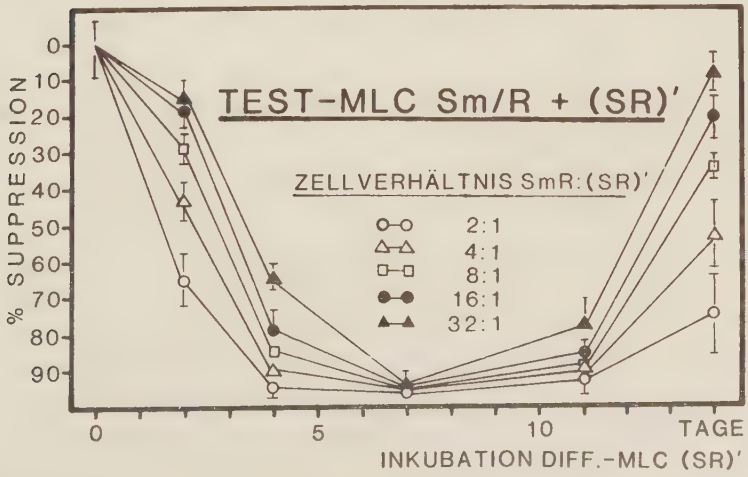

ABBILDUNG 3 Test-MLC mit zellteilungsgehemmten humanen Stimulatorzellen Sm, Responderzellen R und verschiede-

nen Konzentrationen von 2, 4, 7, 11 und 14 Tagen kultivierten Lymphozyten einer Differenzierungs-MLC (SR)'. Die Proliferationsrate der Lymphozyten wurde durch ^{3}H-Thymidineinbau ermittelt und die prozentuale Suppression nach 3.6.3 berechnet.

satz zu den Zellen einer 2-, 4- oder 14-Tage Differenzierungs-MLC. Aus diesen Werten läßt sich ableiten, daß sich für die Suppressorzellaktivitätsbestimmung eine 7-Tage Differenzierungs-MLC gut eignet, wobei aber immer auch eine Titrierung der Zellen von 1:2 bis 1:32 erfolgen sollte, um einen eventuell auftretenden Abfall der Supprimierung erfassen zu können. Die Überstände der Differenzierungs-MLC's weisen in diesem System keine Supprimierungseigenschaften auf, die Inhibierung der Test-MLC muß also zell-vermittelt sein.

4.1.2 Suppressorzellnachweis in einer autologen Lymphozytenkultur

In diesem Zusammenhang war auch interessant zu erfahren, ob sich eine solche Suppressoreigenschaft nur in einer MLC bilden kann, oder ob Lymphozyten auch ohne Fremdstimulus zu Zellen mit Suppressoreigenschaften differenzieren.

Für diese Untersuchungen werden nur Lymphozyten des Typs "R", ähnlich der Differenzierungs-MLC, für 2, 3, 5, 7 und 11 Tage inkubiert und dann in einer Test-MLC in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Es zeigte sich auch in diesem Versuch eine Inhibierung der Test-MLC durch die kultivierten Zellen (Abb.4). Bei Zugabe von 80 µl der jeweiligen Kulturüberstände in die Test-MLC wurde diese in ihrer Proliferation nicht gehemmt. Auffallend war, daß die Inhibierung sehr stark mit der Anzahl der in die Test-MLC eingesetzten autologen Lymphozyten korrelierte, im Gegensatz zur Inhibierungsfähigkeit jener Zellen, die aus einer Differenzierungs-MLC stammten. Mit autologen Lymphozyten einer 7-Tage Kultur wird

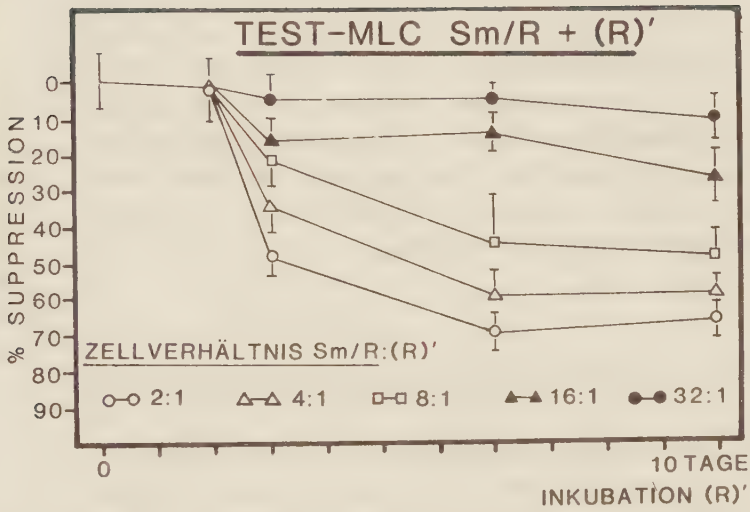

ABBILDUNG 4 Test-MLC mit zellteilungsgehemmten humanen Stimulatorzellen Sm, Responderzellen R und verschiedenen Konzentrationen von 2, 3, 7, und 11 Tagen kultivierten Lymphozyten des Typs R. Die Proliferationsrate der Lymphozyten wurde durch ^{3}H-Thymidineinbau ermittelt und die prozentuale Suppression nach 3.6.3 berechnet.

bei einem Zellverhältnis von R' zu SmR wie 1:2 in der Test-MLC 68% Supprimierung gemessen, die sich aber beim Zellverhältnis von 1:32 auf 5% reduziert. Dies zeigt, daß Lymphozyten, welche einen Fremdstimulus erhalten, Supprimierungseigenschaften wesentlich potenter ausbilden.

Das Verfahren der Kultivierung von autologen Lymphozyten und deren Einsatz in einer Test-MLC eignet sich wegen der Inhibierungsbreite sehr gut für Untersuchungen von Substanzen, die auf Suppressorzellaktivierung getestet werden sollen.

Die bisher vorgestellten Ergebnisse wurden sowohl im Schweine-, als auch im Humansystem erhalten, d.h., es ergaben sich bei der Suppressorzellkultivierung und anschließender Aktivitätsbestim-

mung mit Schweine- bzw. Humanlymphozyten kaum Unterschiede. Die Schweinezellen reagierten nur sensibler auf evt. auftretende Veränderungen der Kulturbedingungen, wie Schwankungen im CO_2-Gehalt. Ein wesentlicher Nachteil aber war, daß keine exakten SLA-Typisierungen(swine leukocyte antigen) vorlagen. Im Humansystem waren die Voraussetzungen besser. Durch die zwischenzeitlich gut etablierte HLA-Typisierung war der Phänotyp der eingesetzten Humanlymphozyten bekannt. Dies war u.a. ein Vorteil bei der Untersuchung zur unspezifischen Ts-Zellbildung.

4.1.3 Spezifische und unspezifische Suppressorzellen

Die bisherigen Ergebnisse gaben Aufschluß über die Wirkung spezifischer Ts-Zellen, da die Differenzierungs-MLC und die Test-MLC gleiche Zellkombinationen aufwiesen(Kurzschreibweise: $(SR_1)'+SmR_1$). Zur Feststellung der Bildung von unspezifischen Ts-Zellen müssen die Responderzellen der Differenzierungs-MLC und der Test-MLC HLA-different sein $(SR_1)'+SmR_2$. In der Abbildung 5 ist die unterschiedliche Proliferationshemmung der Test-MLC durch unspezifische und spezifische Ts-Zellen zu erkennen, die aus einer 4-Tage kultivierten Differenzierungs-MLC stammten. Die Suppressoraktivität der unspezifischen Ts-Zellen ist deutlich geringer gegenüber jener von spezifischen Ts-Zellen. Im Schwein-System war eine solch große Diskrepanz nicht festzustellen.

Wie in 4.1.2 schon erwähnt, ergeben sich in der Ts-Aktivitätsbestimmung mit dem in Abbildung 2 vorgestellten Testverlauf keine Unterschiede bezüglich des Schweine- und Humansystems. Die Zellen einer 7-Tage Differenzierungs-MLC zeigen qualitativ und quantitativ die größte Suppressoraktivität. An Hand dieser Ergebnisse sollte im folgenden die Bedeutung dieses Ts-Systems für die momentanen Vorstellungen über die Immunregulation und den Ablauf von Abstoßungsreaktionen untersucht und diskutiert werden.

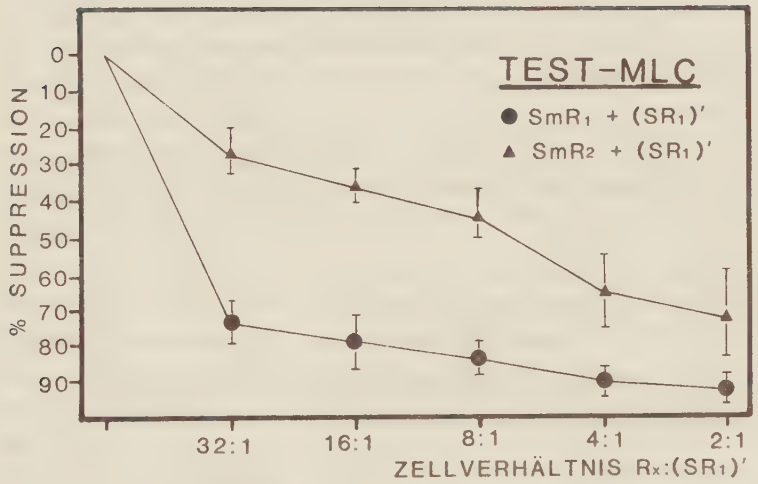

ABBILDUNG 5 Bestimmung von spezifischen und unspezifischen Ts-Zellen in der Test-MLC. Die in einer 4-Tage Differenzierungs-MLC kultivierten humanen Zellen (SR)' wurden in verschiedenen Konzentrationen zu frisch isolierten, zellteilungsgehemmten Stimulator- und Responderzellen SmR_1 bzw. SmR_2 gegeben, weitere sechs Tage kultiviert und mittels ^3H-Thymidineinbau die Proliferationsrate bestimmt. Die Berechnung der prozentualen Suppression geschah nach 3.6.3.

4.1.4 CHARAKTERISIERUNG EINES SUPPRESSORZELLFAKTORS

Die Supprimierungsaktivität in der Differenzierungs-MLC muß, wie in 4.1.1 gezeigt, zellvermittelt sein, da bei Einsatz des Differenzierungs-MLC Überstandes keine Supprimierung der Test-MLC erfolgt, die, wie beschrieben, aus frisch isolierten Stimulatorzellen(zellteilungsgehemmt) und Responderzellen sowie Zellen einer 7-Tage Differenzierungs-MLC besteht. Aus diesem Grunde wurde der Kulturüberstand einer sieben Tage gehaltenen Test-MLC auf Supprimierungsaktivität durch Zugabe in eine neue MLC geprüft. Zur näheren Charakterisierung wurde der Überstand zum einen mit 20 grey gamma-

TABELLE 1 Proliferationshemmung einer Human-MLC, SmR, durch Faktoren des Kulturmediumüberstandes von 7-Tage Differenzierungs-MLC + 7-Tage Test-MLC, (SR)'+SmR. Stimulator- und Responderzellen wurden sieben Tage inkubiert, (SR)', danach wiederum mit frisch isolierten Stimulator- und Responderzellen, SmR, im Verhältnis SmR:(SR)'= 2:1 für weitere sieben Tage kultiviert. Der Kulturüberstand dieses Ansatzes (SmR+(SR)') wurde zu frisch isolierten Zellen des MLC-Typs SmR im prozentualen Anteil von 33, 16, 8 und 4% gegeben. Der Überstand wurde außerdem mit 20 grey gammabestrahlt oder bis -20°C eingefroren und dann eingesetzt. Als Kontrollen dienten die MLC-Kombinationen SmR, SmR+(SR)' und SmR+((SR)'(SR)'').

MLC-KOMBINATION	KULTURÜBERSTAND aus SmR+(SR)' (in %GESAMTVOL.)	% SUPPRESSION
SmR	—	0
SmR +(SR)'	—	93 ± 3
SmR +[(SR)'(SR)'']	—	91 ± 2
SmR	33%	41 ± 5
SmR	16%	38 ± 2
SmR	8%	24 ± 5
SmR	4%	11 ± 4
	ÜBERSTAND bestrahlt	
SmR	33%	34 ± 6
SmR	16%	33 ± 3
SmR	8%	18 ± 4
SmR	4%	10 ± 3
	ÜBERSTAND -20°C eingefroren	
SmR	33%	2 ± 1
SmR	16 %	0 ± 0.5
SmR	8%	1 ± 0.5
SmR	4%	0 ± 0.5

bestrahlt und zum anderen bis -20°C eingefroren , wieder aufgetaut und in der MLC eingesetzt. Die Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse, wobei als Kontrolle u.a. die Supprimierung durch Zellen der Test-MLC

untersucht wurden, d.h., die Zellen einer 7-Tage Differenzierungs-MLC (SR)' wurden für weitere sieben Tage mit frisch isolierten Stimulator- und Responderzellen kultiviert (SR)'', um dann wieder mit frisch isolierten Stimulator- und Responderzellen für weitere sieben Tage kultiviert zu werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß die zellvermittelte Supprimierungsaktivität der "einfachen Differenzierungs-MLC"(SR)' gegenüber der "doppelten Differenzierungs-MLC"((SR)' (SR)'') mit 93 bzw. 91% nahezu gleich stark ausgeprägt ist. Anders verhält es sich mit den Kulturüberständen: Der aus der "einfachen" Differenzierungs-MLC gewonnene Überstand hat, wie bereits erwähnt, keine Supprimierungseigenschaft bezüglich einer gemischten Lymphozytenkultur, während der aus einer "doppelten" Differenzierungs-MLC gewonnene Überstand eine MLC in ihrer Proliferationsfähigkeit um 41% hemmt, wenn der Überstand im Volumenverhältnis von 1:2 zur verwendeten Zellsuspension eingesetzt wird. Beim Volumenverhältnis von 1:25 ist noch eine Proliferationshemmung von 11% festzustellen. Ähnliche Wirkung zeigt der mit 20 grey gammabestrahlte Überstand: Die Supprimierungsaktivität erniedrigt sich zwar bei einem Volumenverhältnis von 1:2 auf 34%, ist aber bei Verwendung von 1:25 immer noch mit 10% annähernd gleich stark wie bei unbestrahltem Überstand. Wurde jedoch der Überstand bei -20°C eingefroren und wieder aufgetaut in der gemischten Lymphozytenkultur eingesetzt, war keine Suppression der Zellproliferation mehr feststellbar.

4.1.5 Beeinflußung der Test-MLC durch lösliche Faktoren aus verschiedenen Lymphozytenkulturüberständen

Im vorherigen Kapitel wurde die Wirkung eines löslichen Faktors beschrieben, der eine Proliferationshemmung in der gemischten Lymphozytenkultur verursachte.Durch die Zugabe von selbst hergestelltem Interleukin-2 in die Test-MLC des Suppressorsystems konnte die inhibierende Wirkung des Suppressorfaktors aufgehoben werden. PHA-stimulierte Lymphozyten sezernieren Interleukin-2 ins Kultur-

TABELLE 2 Wirkung der Überstände von PHA- und Con A-stimulierten humanen Lymphozytenkulturüberständen auf die humane Suppressorzellkultur SmR + (SR)'. Das Zellverhältnis von SmR: (SR)' betrug 2:1. Der Anteil des Überstandes in der Test-MLC betrug 75% bzw. 10%.

MLC-KOMBINATION	EINGESETZTER KULTUR ÜBERSTAND %VOL.-ANTEIL in der frischen MLC	^{3}H-THYMIDIN EINBAU in cpm	%SUPPRESSION
SmR	—	45 193 ± 1230	0
SmR + (SR)'	—	3 163 ± 280	93
	ÜBERSTAND aus PHA-stim. LYMPHOZYTENKULTUR		
SmR + (SR)'	75%	19 432 ± 1028	57
SmR + (SR)'	10%	12 202 ± 702	73
(SR)'	—	758 ± 117	—
(SR)'	75%	15 365 ± 508	—
(SR)'	10%	4 971 ± 397	—
	ÜBERSTAND aus CON A-stim. LYMPHOZYTENKULTUR		
SmR + (SR)'	75%	3 087 ± 480	93
SmR + (SR)'	10%	3 205 ± 425	93

medium (22). Deshalb wurden Kulturüberstände von drei Tage mit PHA-stimulierten Lymphozyten gewonnen und in verschiedenen Volumenverhältnissen zu einer Test-MLC gegeben. Als Vergleich dienten Kulturüberstände von Con A-stimulierten Lymphozyten.

Aus der Tabelle 2 kann man ersehen, daß der Überstand von Con A-stimulierten Lymphozytenkulturen in einer Testkonzentration von 75% bzw. 10% keine Veränderung gegenüber der Kontrolle zeigt. Die Suppression beträgt jedesmal 93%. Ein anderes Bild ergibt sich bei Einsatz der Überstände aus PHA-stimulierten Lymphozytenkulturen. Wenn 75% bzw. 10% des Volumens einer Test-MLC aus gewonnenen "PHA-Überständen" besteht, wird die Proliferationshemmung von 93% auf 57% bzw. 73% erniedrigt. Zu diesem, auf den ersten Blick eindeutigen

Ergebnis, müssen aber auch die Resultate der adäquaten Kontrollversuche betrachtet werden. Um zu einer detaillierten Aussage zu gelangen, mußte gewährleistet sein, daß der zusätzliche ^{3}H-Thymidineinbau in der Test-MLC nicht durch Proliferation der Zellen aus der 7-Tage Differenzierungs-MLC herrührt, sondern ausschließlich die frisch isolierten Zellen der Test-MLC proliferierten. Deshalb wurden die Zellen der Differenzierungs-MLC nach sieben Tagen in eine neue, 75% bzw. 10% "PHA-Überstand" enthaltene Kultur eingesetzt und weitere sieben Tage kultiviert. Der Kontrollansatz, ohne "PHA-Überstand" im Medium, zeigt einen ^{3}H-Thymidineinbau von 758 cpm, während die 75% "PHA-Überstand enthaltene Kultur mit 15 365 cpm proliferiert. Dies Ergebnis offenbart, daß die Aufhebung der Test-MLC Supprimierung nicht ausschließlich auf der Wirkung der frisch isolierten Lymphozyten beruht.

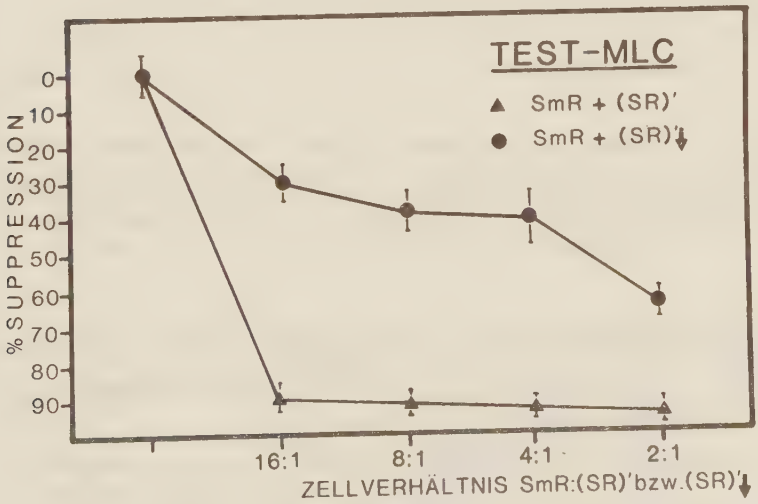

ABBILDUNG 6 Vergleich von bestrahlten und unbestrahlten humanen Suppressorzellen. Die Zellen der Differenzierungs-MLC (SR)' wurden nach Gammabestrahlung↓ (20 grey) mit frisch isolierten Stimulator- und Responderzellen in der Test-MLC auf Proliferationsinhibierung, gemessen mittels ^{3}H-Thymidineinbau, getestet.

Für weitere Untersuchungen mußte deshalb mit nicht mehr teilungsfähigen Zellen der 7-Tage Differenzierungs-MLC gearbeitet werden. Dies wurde durch Gammabestrahlung mit einer Dosis von 20 grey erreicht. Abbildung 6 zeigt den Unterschied der Test-MLC Supprimierung durch bestrahlte und unbestrahlte Zellen einer 7-Tage Differenzierungs-MLC: Der Suppressoreffekt, ausgehend von den bestrahlten Lymphozyten ist qualitativ geringer als der von unbestrahlten Lymphozyten. Dennoch eignet sich diese Methode zur Untersuchung der Wirkung von T-Zellwachstumsfaktoren, da die Suppression bei dem Zellverhältnis Differenzierungs-MLC zu Test-MLC wie 1:2 immer noch einen Wert von 62% erreicht. Als Quelle für Interleukin-2 wurde diesmal der Kulturüberstand einer 4-Tage MLC verwendet, die ohne Serumzusatz kultiviert wurde. Es ist bekannt, daß Lymphozyten in vitro durch einen allogenen Stimulus in den ersten Kulturtagen einen Wachstumsfaktor sezernieren, der aber durch Serumbestandteile in der Kultur adsorbiert und damit unwirksam wird. Daß in den isolierten Kulturüberständen ein Faktor vorhanden sein muß, der die Suppression der Test-MLC durch Zellen einer 7-Tage

TABELLE 3 Wirkung eines serumfreien 4-Tage MLC-Überstandes auf die Suppressorzellkultur SmR+(SR)', wobei die Zellen der Differenzierungs-MLC mit 20 grey bestrahlt wurden. Der Überstandsanteil in der Test-MLC betrug 75 bzw. 25 Volumen%. Die Proliferation wurde am siebten Tag der Test-MLC durch ^{3}H-Thymidineinbau bestimmt.

MLC-KOMBINATION	EINGESETZTER KULTURÜBERSTAND aus 4-TAGE-MLC in VOL.%	^{3}H-THYMIDIN EINBAU in cpm	%SUPPRESSION
SmR	—	41 815 ± 2850	0
SmR + (SR)'	—	13 380 ± 1055	68
SmR + (SR)'	75%	28 852 ± 1827	31
SmR + (SR)'	25%	21 743 ± 1211	48
(SR)'	—	45 ± 6	—
(SR)'	75%	50 ± 4	—

Differenzierungs-MLC teilweise aufheben kann, ist den Ergebnissen der Tabelle 3 zu entnehmen. Wenn 75 Volumen% der Test-MLC Ansätze aus gewonnenem Kulturüberstand besteht, wird die prozentuale Suppression gegenüber dem Kontrollansatz von 68 auf 31 erniedrigt. Bei 25 Volumen% Kulturüberstandzusatz beträgt die Suppression 48%. Die Kontrollansätze mit den Zellen der 7-Tage Differenzierungs-MLC zeigen weiterhin, daß diese Lymphozyten nicht an der Proliferation der Test-MLC beteiligt sein können, da weder mit noch ohne Kulturüberstandzusatz ein ^{3}H-Thymidineinbau in die unter gleichen Bedingungen wie die Test-MLC kultivierten Zellen erfolgte.

4.1.6 Suppressorzellaktivierung durch Histamin

In der neueren Literatur wird ein von T-Suppressorzellen exprimierter Histaminrezeptor diskutiert. Die Möglichkeit einer Suppressorzellaktivierung durch Histamin sollte im vorliegenden Testsystem untersucht werden.

Wie sich verschiedene Histaminkonzentrationen auf die Proliferation von Responderzellen einer gemischten Lymphozytenkultur auswirken, wurde mittels ^{3}H-Thymidineinbau und in Gegenwart von 0,05M, 0,001 M, 0,0001 M und 0,00001 M Histamindihydrochlorid ($C_5H_{11}Cl_2N_3$) im Kulturmedium getestet. Tabelle 4 zeigt die Einbaurate in cpm.

Tabelle 4 Einbau von ^{3}H-Thymidin am siebten Tag einer humanen gemischten Lymphozytenkultur bei verschiedenen Histaminkonzentrationen.

MLC-KOMBINATION	^{3}H-THYMIDINEINBAU in cpm bei HISTAMINKONZENTRATION von				
	0	$5x10^{-2}$M	10^{-3}M	10^{-4}M	10^{-5}M
Sm/R	33 596 ± 2210	34 140 ± 3115	33 428 ± 1021	31 887 ± 3240	34 085 ± 2830

Es ist zu erkennen, daß bei den eingesetzten Histaminkonzentrationen keine signifikanten Änderungen, sei es Inhibierung oder Stimulierung, der MLC-Proliferation erfolgt.

Für die Prüfung der Suppressorzellaktivierung durch Histamin wurden autologe Lymphozytenkulturen für sieben Tage mit den oben genannten Histaminkonzentrationen inkubiert. Die isolierten Zellen und die jeweiligen Kulturüberstände wurden dann durch Zugabe zu einer Test-MLC auf ihre Supprimierungseigenschaft überprüft. Es zeigte sich, daß Lymphozyten, welche mit 0,001 M Histamin enthaltendem Medium kultiviert wurden, die größte Hemmung der Proliferation der Test-MLC hervorrufen. Die Überstände verursachen keinen inhibierenden Effekt. Die Abbildung 7 zeigt den Vergleich von nicht stimulierten Kontrollymphozyten zu Lymphozyten, die mit 0,001 M Histamin stimuliert worden waren.

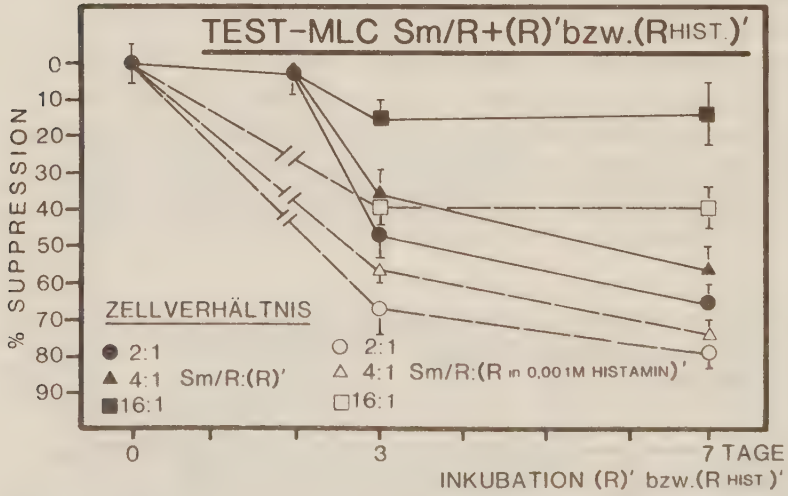

ABBILDUNG 7 Wirkung von drei und sieben Tage lang in 0,001 M Histamin kultivierten humanen Lymphozyten (RHist)' auf die Proliferation einer frisch angesetzten Test-MLC, gemessen mittels ^{3}H-Thymidineinbau am siebten Kulturtag. Das Verhältnis der frisch isolierten Zellen,SmR, zu den histaminaktivierten- bzw. Kontrollzellen betrug 2:1, 4:1 und 16:1.

Darin ist zu erkennen, daß die in Gegenwart von 0,001 M Histamin inkubierten autologen Lymphozyten (R $_{Hist.}$)' eine stärkere Supprimierung der Test-MLC verursachen als autologe Lymphozyten (R)', die ohne Histaminzusatz kultiviert wurden. Bei dem Zellverhältnis von Test-MLC-Zellen,SmR, zu autolog kultivierten Lymphozyten (R)' bzw. (R $_{Hist.}$)' von 2:1 verursachten die dreitägig mit Histaminzusatz kultivierten autologen Zellen eine um 20% stärkere Supprimierung der Test-MLC als die Kontrollymphozyten; bei sieben Tage kultivierten Zellen lag der Unterschied bei 16%.

4.1.7 Suppressorzellaktivierung durch Concanavalin A

Concanavalin A (Con A) ist ein globuläres Protein aus der Schwertbohne (Canavalia ensiformis) und hat eine ausgeprägte mitogene Ak-

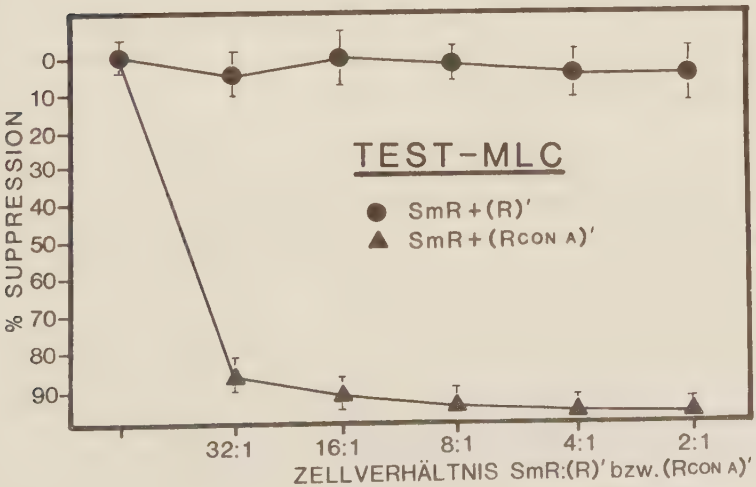

Abbildung 8 Wirkung von zwei Tage mit Con A-stimulierten (25µg/ml) humanen Lymphozyten (RCon A)' auf die Proliferation einer frisch angesetzten humanen Test-MLC SmR, gemessen mittels ^{3}H-Thymidineinbau am siebten Kulturtag.

tivität. T-Lymphozyten werden nach einer Stimulierung mit gelöstem Con A zur Transformation angeregt. Weiterhin soll eine solche Zellpopulation eine größere T-Zellsuppressoraktivität aufweisen. Diese Eigenschaft der erhöhten Suppressoraktivität wurde im vorliegenden Test-System untersucht.

Lymphozyten eines Genotyps wurden mit 25 µg/ml Con A für zwei Tage inkubiert. Dies ist der Zeitpunkt des größten ^{3}H-Thymidineinbaus in die proliferierenden Lymphozyten. Nach sorgfältigem Auswaschen des Con A wurden die Lymphozyten mit frisch isolierten Stimulator- und Responderzellen in verschiedenen Zellverhältnissen in einer Test-MLC sieben Tage kultiviert. Die supprimierende Wirkung der Con A-stimulierten Zellen auf den ^{3}H-Thymidineinbau der Test-MLC ist in Abbildung 8 dargestellt. Das Bild zeigt nahezu vollständige Inhibierung der Test-MLC Proliferation bei einem Zellverhältnis SmR:(R Con A)' wie 2:1 gegenüber dem Kontrollansatz. Sogar bei einem Zellverhältnis von 32:1 wird noch eine Suppression von 84% erreicht.

4.1.8 Einfluß eines Streptomycetenextraktes (STEX) auf Ts-Zellbildung und mitogene Aktivität

Für die Untersuchungen wurde der lyophylisierte, aus den gram-positiven Bakterien Streptomycetes tendae Ettlinger isolierte, Extrakt sechsmal zehn Sekunden unter Kühlung ultrabeschallt und danach zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer STEX-Konzentration von 1 mg/ml als Stammlösung verwendet.

Zur Feststellung der Suppressoraktivität wurden Lymphozyten des Typs R_1 mit 50 µg/ml STEX für vier Tage kultiviert. Es hatte sich erwiesen (100), daß diese STEX-Konzentration für die Suppressoraktivitäts-Stimulierung am besten geeignet war (Ergebnisse im Einzelnen nicht aufgeführt). Nach sorgfältigem Auswaschen des STEX wurden die Zellen (R_1 STEX)' in verschiedenen Zellverhältnissen mit frisch isolierten Stimulator(Sm)- und Responderzellen in der Test-MLC sieben weitere Tage kultiviert. Bei der Bestimmung der

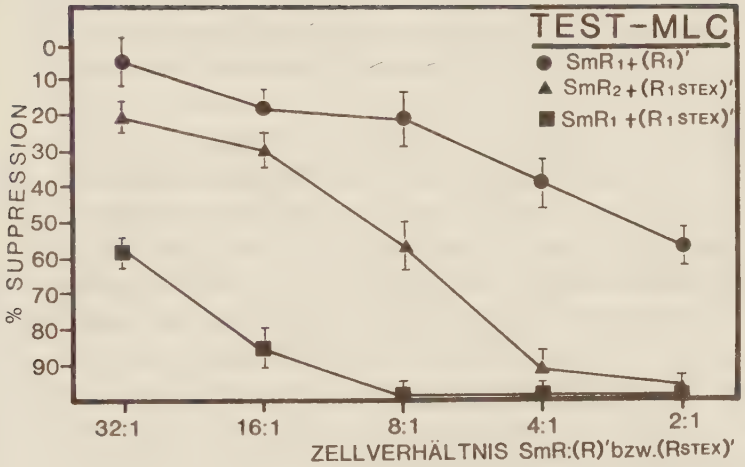

ABBILDUNG 9 Induktion von Suppressoraktivität durch Streptomycetenextrakt(STEX). Humane Lymphozyten (R)' wurden vier Tage in 50µg/ml STEX kultiviert, dann in verschiedenen Verhältnissen in einer humanen Test-MLC auf spezifische und unspezifische Suppression der Proliferation untersucht.

spezifischen Suppressoraktivität wurden in der Test-MLC Responderzellen des Typs R_1 eingesetzt, bei Bestimmung der unspezifischen Suppressoraktivität waren dies Zellen des Typs R_2, die mit denen des Typs R_1 nicht HLA-identisch waren. Die mit 50 µg/ml STEX kultivierten Lymphozyten verursachten, wie in Abbildung 9 ersichtlich, sowohl bei spezifischer als auch bei unspezifischer Testkonstellation eine starke Proliferationshemmung der Test-MLC, wenn das Zellverhältnis SmR:(R STEX)' wie 2:1 war. Beim Zellverhältnis von 8:1 ist aber die Suppression der unspezifischen Kombination auf 58% abgesunken, während die der spezifischen immer noch 98% beträgt und der Kontrollwert ($SmR_1+(R_1)'$) bei 21% liegt.

Zur Prüfung der mitogenen Aktivität des Extraktes wurden peri-

phere Blutlymphozyten mit Hilfe der B-Zell Adhärenz an Nylonwolle in B- und T-Lymphozyten getrennt. Die Trennungseffektivität wurde mit der indirekten Immunfluoreszens untersucht. Dabei konnte bei fast allen Zellen der B-Zellfraktion eine Fluoreszens beobachtet werden, wenn als erster Antikörper Kaninchen-anti-human Ig und als zweiter Antikörper FITC-konjugiertes Ziegen-anti-Kaninchen Ig verwendet wurden. Die getrennten Fraktionen und die ungetrennten Zellpopulationen wurden durch verschiedene STEX-Konzentrationen stimuliert. Dabei ergab sich, daß wiederum eine STEX-Konzentration von 50 µg/ml den besten Effekt erzielte(Ergebnisse nicht im Einzelnen aufgeführt). Die Abbildung 10 zeigt den ^{3}H-Thymidineinbau in mit STEX-stimulierte, getrennte und ungetrennte Lymphozytenpopulationen über den Zeitraum von sechs Tagen. Die Proliferation der T-Zellpopulation erreicht schon zwischen dem 2. und 3. Kultivierungstag den dreifachen Wert der Proliferation von B-Zellen und der unge-

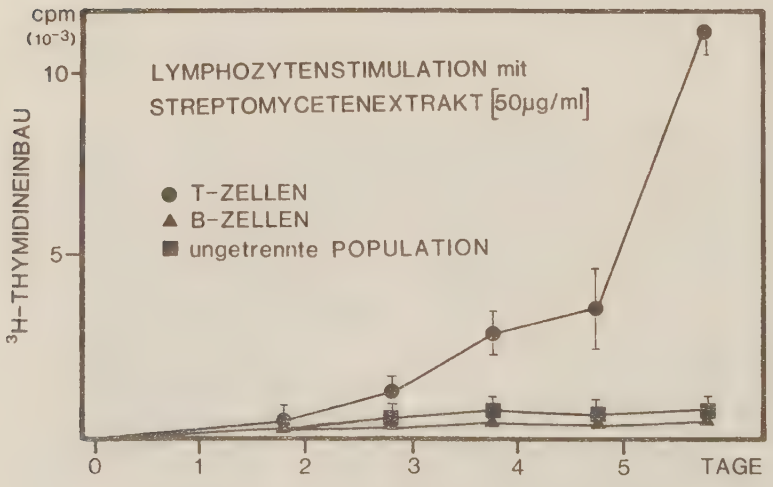

ABBILDUNG 10 Stimulation von getrennten humanen Lymphozyten mit STEX. B-, T- und ungetrennte Lymphozyten wurden mit 50µg/ml STEX stimuliert und die Proliferation während sechs Tagen durch ^{3}H-Thymidineinbau bestimmt.

trennten Population. Am sechsten Kultivierungstag erreichte der ^{3}H-Thymidineinbau bei stimulierten T-Lymphozyten einen Wert von 11 300 cpm, während bei den anderen zwei stimulierten Populationen jeweils ein Wert unter 400 cpm gemessen wurde.

4.2 Untersuchungen zur Suppressoraktivität nach Schweineorgantransplantationen

Im folgenden werden die Ergebnisse zur Suppressorzellaktivität in verschiedenen Organen bei leber- und nierentransplantierten Schweinen vorgestellt.

4.2.1 Suppressorzellaktivität bei allogener Lebertransplantation am Schwein

Die Spender-Empfänger Kombination wurde wie schon beschrieben ausgewählt. Die Spenderleber wurde orthotop transplantiert, d.h., an der Stelle der Empfängerleber eingesetzt. Eine Alternative zur orthotopen ist die auxiliäre Organtransplantation, bei welcher das Transplantat zur Funktionsunterstützung des betreffenden Organs an anderer Stelle im Körper eingesetzt wird.
Es galt nun zu untersuchen, wie sich die Suppressoraktivität über einen Zeitraum vor und nach der Transplantation entwickelt. Die Empfängertiere unterlagen keiner Medikation mit Immunsuppressiva. Damit wurde gewährleistet, daß die Immunreaktion der Tiere nicht unterdrückt oder verändert wurde.
Bei den in vitro Untersuchungen wurden sowohl spezifische als auch unspezifische Suppressorzellaktivitäten bestimmt, indem Zellen einer 7-Tage Differenzierungs-MLC zu einer frisch angesetzten Test-MLC gegeben wurden. Als Stimulatorzellen Sm sind für die spezifische Suppressorzelluntersuchung Lymphozyten eines Tieres genommen worden, das bei der Lebertransplantation als Spendertier fungierte. Da das Tier die Organentnahme nicht überlebte, mußten die Lymphozy-

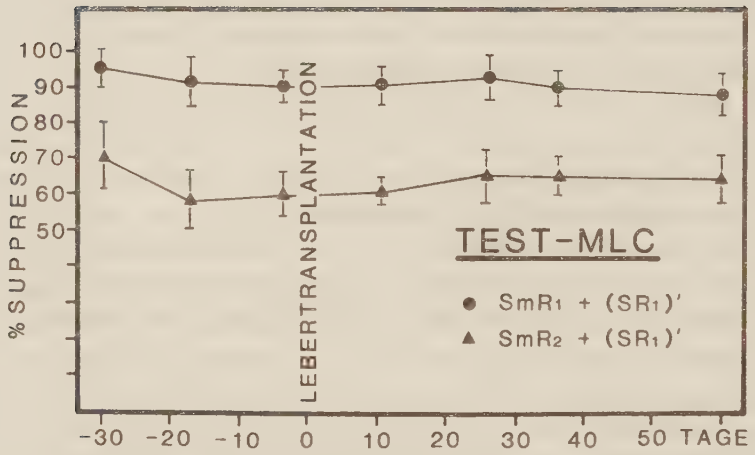

ABBILDUNG 11 Spezifische und unspezifische Suppressorzellbildung vor und nach einer Lebertransplantation. Lymphozyten aus einer 7-Tage Differenzierungs-MLC (SR)' wurden mit frisch isolierten Lymphozyten Sm und R_1 bzw. R_2 in der Test-MLC im Verhältnis SmR:(SR)' wie 2:1 für weitere sechs Tage kultiviert, danach die Proliferationsrate durch ^{3}H-Thymidineinbau bestimmt und die prozentuale Suppression nach 3.6.3 berechnet.

ten für die in vitro Untersuchungen nach der Transplantation eingefroren werden. Für die Charakterisierung der unspezifischen Suppressorzellen wurden in der Test-MLC Lymphozyten eines dritten Tieres R_2 als Responderzellen eingesetzt. Dieses dritte Tier war mindestens haploidentisch bezüglich des MHC mit dem Leberempfängertier R_1: Die Lymphozyten beider Tiere proliferierten in der gemischten Lymphozytenkultur, so daß eine vollständige SLA-Differenz vorgelegen haben muß.

Innerhalb dreißig Tagen vor der Transplantation wurden dreimal die Suppressorzellaktivitäten von Lymphozyten der unbehandelten Tiere bestimmt, um sie mit den Werten nach der Transplantation zu vergleichen. Die postoperativen Untersuchungen erstreckten sich über zwei Monate, wobei viermal die Suppressorzellaktivität be-

stimmt wurde. In der Abbildung 11 ist der zeitliche Verlauf der Suppressionsaktivitäten aufgetragen und es zeigt sich, daß vor und nach der Transplantation in der in vitro Bildung sowohl von spezifischen als auch von unspezifischen Suppressorzellen kein signifikanter Unterschied besteht.

4.2.2 In vitro Wirkung von kultivierten Suppressorzellkulturen auf die Bildung von cytotoxischen T-Lymphozyten vor und nach einer Lebertransplantation beim Schwein

Die Aktivität von cytotoxischen T-Lymphozyten läßt sich in vitro mit Hilfe der CML (zellvermittelte Lympholyse=cell mediated lympholysis) feststellen, die auf der ^{51}Chrom-Freisetzungs Methode basiert. Vor und nach einer Lebertransplantation wurde jeweils ein Wert bestimmt. Lymphozyten des Empfängertiers wurden als Responderzellen R mit Stimulatorzellen Sm eines mindestens haploidentischen

Tabelle 4 CML mit Suppressorzellkulturen fünfzehn Tage vor und 27 Tage nach einer Lebertransplantation beim Schwein. Das Verhältnis von Effektor- zu Targetzellen war jeweils 100:1. Berechnung von %SSR siehe 3.6.5.5. Targetzellen waren Lymphozyten des MLC-Stimulators S und MLC-Responders R sowie Zellen eines dritten Tieres X, die nicht SLA identisch mit dem Zelltyp S waren.

MLC-Effektor Kombination	CML 15 Tage Prätransplant ^{51}Cr-Freisetzung in %SSR			CML 27 Tage Posttransplant ^{51}Cr-Freisetzung in %SSR		
	Targetzellen			Targetzellen		
	S	R	X	S	R	X
SmR	31,6%	0,7%	0,2%	35,2%	0,9%	0,5%
SmR+(SR)'	33,4%	0,7%	0,5%	35,8%	1,2%	0,9%

Tieres in einer 7-Tage Differenzierungs-MLC kultiviert, dann mit frisch isolierten Stimulator- und Responderzellen gleichen Typs weiter kultiviert. Am siebten Inkubationstag wurde die Fähigkeit der zellvermittelten Lyse dieser so kultivierten Zellen gegen sogenannte Targetzellen getestet. Als Targetzellen dienten zum einen Lymphozyten des Stimulatorzelltyps, zum anderen Lymphozyten des Empfängertieres und eines dritten Tieres, die genetisch nicht identisch mit denen des Stimulatorzelltyps waren.

Die erhaltenen Ergebnisse in Tabelle 4 zeigen, bestimmt 15 Tage vor bzw. 27 Tage nach der Transplantation, keine signifikanten Veränderungen der cytotoxischen Aktivität der untersuchten Kulturen.

4.2.3 Suppressorzellbestimmung an Milzzellen, Lymphknotenzellen und Lymphozyten aus peripherem Blut bei nichttransplantierten Schweinen

Die Untersuchungen wurden mit der Fragestellung durchgeführt, ob sich Unterschiede in der Suppressoraktivität bei Zellen aus verschiedenen Organen bei nichttransplantierten, leber- und nierentransplantierten Tieren nachweisen lassen. Zu diesem Zweck mußte ein adäquates Untersuchungssystem gefunden werden, da der oben vorgestellte Suppressorzell-Test (Abb. 2) bei dieser Problemstellung nicht angewendet werden konnte, weil bei der Organentnahme die Tiere getötet werden mußten und deshalb für eine Test-MLC zu späterem Zeitpunkt keine frisch isolierten Zellen vorhanden gewesen wären. Die Änderung des Testverlaufs lag gewissermaßen in einer Zusammenfassung von Differenzierungs-MLC und Test-MLC: Zu mitomycinbehandelten oder bestrahlten Stimulatorzellen Sm und Responderzellen,aus Milz R_M, Lymphknoten R_L und Lymphozyten aus peripherem Blut R_P des Transplantatempfängers isoliert, wurden in verschiedenen Kombinationen zellteilungsgehemmte Milzzellen $(R_M)m$, Lymphknotenzellen $(R_L)m$ und Lymphozyten aus dem peripheren Blut $(R_P)m$ des Empfängers gegeben. Die Stimulatorzellen wurden jeweils aus dem peripheren Blut der Spendertiere am Tag der Transplantation

isoliert und in flüssigem Stickstoff bis zum Gebrauch aufbewahrt. Bei den Kombinationen wo keine Spenderlymphozyten eingefroren wurden, sind Zellen eines nicht an der Transplantation beteiligten Tieres, die aber stimulierend in der MLC auf die Responderzellen wirkten, verwendet worden. Die Ergebnisse der verschiedenen MLC-Kombinationen zur Feststellung der Suppressoraktivität von Zellen aus nicht transplantierten Schweinen sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Dabei zeigt sich, daß Milz- und Lymphknotenzellen weitaus größere Suppressoreigenschaften entwickeln als Lymphozyten aus

TABELLE 5 Bestimmung der MLC-Proliferation von Milzzellen, Lymphknotenzellen und Lymphozyten aus peripherem Blut mittels ^{3}H-Thymidineinbau von nichttransplantierten Schweinen. Zu der MLC-Kombination von zellteilungsgehemmten Stimulatorzellen Sm und Responderzellen R_X der entsprechenden Tiere wurden zellteilungsgehemmte Milzzellen $(R_M)m$, Lymphknotenzellen $(R_L)m$ oder periphere Lymphozyten $(R_P)m$ im Verhältnis SmR_X: $(R_Y)m$ wie 2 : 1 gegeben. Als Kontrollen dienten die Kombinationen SmR_X und $SmR_X + (R_X)m$. Die Berechnung der prozentualen Suppression geschah nach 3.6.3.

MLC-KOMBINATIONEN	% SUPPRESSION ZELLEN VON NICHT TRANSPLANTIERTEN TIEREN (n=5)	
SmR_P	0	KONTROLLEN
$SmR_P + (R_P)m$	1 ± 1	
$SmR_P + (R_M)m$	58 ± 16	
$SmR_P + (R_L)m$	64 ± 19	
SmR_M	0	KONTROLLEN
$SmR_M + (R_M)m$	-1 ± 0.5	
$SmR_M + (R_P)m$	4 ± 1	
$SmR_M + (R_L)m$	54 ± 21	
SmR_L	0	KONTROLLEN
$SmR_L + (R_L)m$	4 ± 2	
$SmR_L + (R_P)m$	7 ± 1.5	
$SmR_L + (R_M)m$	78 ± 10	

peripherem Blut,nämlich 58%/78% und 64%/54% Suppression bei Milz- bzw. Lymphknotenzellen gegenüber 7%/4% Suppression bei Lymphozyten aus peripherem Blut.

4.2.4 Suppressorzellbestimmung an Milzzellen, Lymphknotenzellen und peripehren Lymphozyten bei Leber-transplantierten Schweinen.

Die Zellen von neun lebertransplantierten Schweinen wurden nach

Tabelle 6 Bestimmung der MLC-Proliferation von Milzzellen, Lymphknotenzellen und Lymphozyten aus peripherem Blut lebertransplantierter Schweine mittels ^{3}H-Thymidineinbau. Zu der MLC-Kombination von zellteilungsgehemmten Stimulatorzellen Sm und Responderzellen R_x der entsprechenden Tiere wurden zellteilungsgehemmte Milzzellen $(R_M)m$. Lymphknotenzellen $(R_L)m$ oder periphere Lymphozyten $(R_L)m$ im Verhältnis SmR_x : $(R_y)m$ wie 2:1 gegeben. Als Kontrollen dienten die Kombinationen SmR_x und $SmR_x + (R_x)m$.

MLC-KOMBINATIONEN	% SUPPRESSION ZELLEN VON LEBER-TRANSPLANTIERTEN TIEREN (n=7)	
SmR_P	0	KONTROLLEN
$SmR_P + (R_P)m$	2 ± 1	
$SmR_P + (R_M)m$	$1 \pm 0,5$	
$SmR_P + (R_L)m$	3 ± 1	
SmR_M	0	KONTROLLEN
$SmR_M + (R_M)m$	2 ± 1	
$SmR_M + (R_P)m$	$5 \pm 1,5$	
$SmR_M + (R_L)m$	3 ± 1	
SmR_L	0	KONTROLLEN
$SmR_L + (R_L)m$	$-1 \pm 0,5$	
$SmR_L + (R_P)m$	$0 \pm 0,5$	
$SmR_L + (R_M)m$	3 ± 1	

einer Überlebenszeit der Tiere zwischen 5 bis 26 Wochen nach dem gleichen Schema wie bei 4.2.3 auf Suppressoraktivität untersucht. Aus der Tabelle 6 ist ersichtlich, daß keine Suppressoraktivitäten nachweisbar waren, d.h., daß evt. vor der Transplantation in Milz und Lymphknoten vorhandene Suppressorzellen nach einer Lebertransplantation in diesen Organen nicht mehr feststellbar waren.

Die histologischen Untersuchungen der Leberpräparate, welche nach der Organentnahme angefertigt wurden, erbrachten leichte Anzeichen von Abstoßungsreaktionen, die aber makroskopisch nicht diagnostizierbar waren (101). Im Serum der Tiere, zum Zeitpunkt der Organentnahme gewonnen, waren Antikörper der Ig G-Klasse nachweisbar, die bei Zugabe in eine gemischte Lymphozytenkultur sowohl mit Zellen von nicht an der Transplantation beteiligten Tieren als auch mit Zellen der Transplantationskombination eine starke Verminderung des ^{3}H-Thymidineinbaus verursachten (101). Weiterhin war am 6. bis 8. postoperativen Tag stets ein Anstieg cytotoxischer Antikörper, die im CTX mit 0-10% bis über 90% bestimmt worden waren, feststellbar (101).

4.2.5 Suppressorzellbestimmung an Milzzellen, Lymphknotenzellen und peripheren Lymphozyten bei nierentransplantierten Schweinen

Bei zwei nierentransplantierten Schweinen ergaben die nach drei Wochen postoperativ durchgeführten Untersuchungen nachweisbare Suppressoraktivitäten in Milz- und Lymphknotenzellen (s.Tab. 7). Die entnommenen Nieren zeigten schon makroskopisch Anzeichen akuter Abstoßung, was auch durch die histologischen Untersuchungen bestätigt werden konnte.

Tabelle 8 ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse von den Untersuchungen auf Suppressoraktivitäten bei verschiedenen Transplantationen. Hervorzuheben ist, daß bei Lebertransplantationen im Gegensatz zu Nierentransplantationen keine Suppressorzellen in Milz und Lymphknoten nachgewiesen werden können.

TABELLE 7 Bestimmung der MLC-Proliferationsinhibierung durch Milzzellen, Lymphknotenzellen und peripheren Lymphozyten mittels ^{3}H-Thymidineinbau von nierentransplantierten Schweinen. Ausführung siehe Text zu Tabelle 6.

MLC-KOMBINATIONEN	% SUPPRESSION ZELLEN VON NIEREN TRANSPLANTIERTEN TIEREN (n=2)	
SmR_P	0	KONTROLLEN
$SmR_P + (R_P)m$	8 ± 2	
$SmR_P + (R_M)m$	24 ± 6	
$SmR_P + (R_L)m$	38 ± 8	
SmR_M	0	KONTROLLEN
$SmR_M + (R_M)m$	9 ± 2	
$SmR_M + (R_P)m$	65 ± 12	
$SmR_M + (R_L)m$	55 ± 15	
SmR_L	0	KONTROLLEN
$SmR_L + (R_L)m$	3 ± 1	
$SmR_L + (R_P)m$	51 ± 12	
$SmR_L + (R_M)m$	23 ± 5	

TABELLE 8 Zusammenfassung der Tabellen 5, 6 und 7. Gegenüberstellung der prozentualen Suppression der aus peripherem Blut, Milz und Lymphknoten isolierten Lymphozyten in einer MLC bei leber-, nieren- und nichttransplantierten Schweinen.

TRANSPLANTATIONSTYP	HISTOLOGISCHER BEFUND	MLC-INHIBIERUNG DURCH ZELLEN ISOLIERT AUS		
		PERIPHEREM BLUT	MILZ	LYMPHKNOTEN
KONTROLLTIERE (n=5) OHNE TRANSPLANTATION		ca. 0%	ca. 68%	ca. 59%
LEBER (n=7)	GERINGE ABSTOSSUNG	ca. 0%	ca. 0%	ca. 0%
NIERE (n=2)	AKUTE ABSTOSSUNG	ca. 58%	ca. 23%	ca. 47%

4.2.6 Suppressoraktivität von Leberzellen

Die Untersuchungen wurden mit der Fragestellung weitergeführt, ob aus der Leber isolierte Zellen (Methode s. 3.1.4) in einer MLC proliferationshemmend wirken können. Dazu wurden aus einer nichttransplantierten Schweineleber Zellen isoliert. Die Leber wurde bei einer Transplantation dem Empfängertier,R, entnommen, dem daraufhin die Leber eines Spendertieres,S, transplantiert wurde. Mit einer PHA- und Con A-Stimulation wurde die mitogene Reaktivität der Zellen ermittelt. Tabelle 9 zeigt die Proliferationsrate von Leberzellen,RLeber, im Vergleich mit Blutlymphozyten,PBL, von beiden Tieren S und R.

Tabelle 9 Mitogene Zellstimulation. Periphere Blutlymphozyten,PBL, von zwei nichttransplantierten Tieren, die bei nachfolgender Lebertransplantation als Spender S und Empfänger R wirkten, sowie Leberzellen des Empfängertiers wurden mit 5 µg/ml PHA bzw. 25 µg/ml Con A drei Tage inkubiert und durch ^{3}H-Thymidineinbau die Proliferation bestimmt.

ZELLTYP	PROLIFERATION gemessen durch ^{3}H-THYMIDINEINBAU in cpm	
	stimuliert mit PHA	stimuliert mit Con A
SPBL	28 603 ± 5180	—
RPBL	54 756 ± 6360	—
RLEBER	14 410 ± 3970	1 715 ± 215

Die inhibitorische Wirkung der isolierten Leberzellen in einer MLC zeigt die Abbildung 12. Zu zellteilungsgehemmten Stimulatorzellen Sm und Responderzellen R wurden zellteilungsgehemmte Responderleberzellen (RLeber)m in verschiedenen Zellverhältnissen zugegeben. Die Proliferation der MLC wird dabei, mit dem Zellverhältnis SmR:(RLeber)m wie 2:1, zu 97% inhibiert.

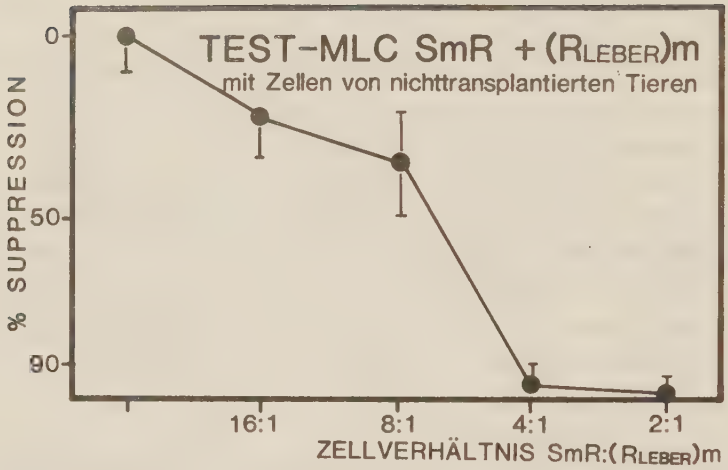

ABBILDUNG 12 Prozentuale Suppression einer MLC durch Leberzellen eines nichttransplantierten Tieres. Zellteilungsgehemmte Stimulatorzellen Sm (Tier fungierte bei Transplantation als Spender) und Responderzellen (Tier fungierte als Empfänger) wurden in verschiedenen Zellverhältnissen mit zellteilungsgehemmten Leberzellen des Empfängertieres (RLeber)m sechs Tage inkubiert und durch ^{3}H-Thymidineinbau die Proliferationsrate bestimmt. Berechnung:

$$\% \text{ Suppression} = 1-\left(\frac{\text{cpm von SmR + (RLeber)m}}{\text{cpm von SmR}} \times 100\right)$$

Das Empfängertier wurde fünf Wochen nach der Transplantation getötet und Zellen aus Milz, Lymphknoten, Leber und peripherem Blut isoliert. Tabelle 10 zeigt die mitogene Aktivierung nach Stimulation mit PHA und Con A der verschiedenen Zelltypen, wobei zu erkennen ist, daß die Proliferation der Leberzellen bei Stimulation mit PHA deutlich geringer ist als die der anderen stimulierten Lymphozyten. Bei der Con A-Stimulierung ist dieser Unterschied nicht festzustellen.

Die Leberzellen wurden weiterhin auf Supprimierungsaktivität in einer MLC, bestehend aus zellteilungsgehemmten peripheren Blutlymphozyten (am Tag der Transplantation eingefroren) und Zellen des Empfängers, untersucht. Tabelle 11 zeigt die prozentuale Suppression von verschiedenen MLC-Kombinationen bei Zugabe zellteilungsgehemmter Leberzellen im Zellverhältnis SmR : (RLeber)m wie 2:1. Die Proli-

feration der gemischten Lymphozytenkulturen wird zwischen 80 bis 85% gehemmt.

TABELLE 10 Mitogene Zellstimulation mit Zellen eines fünf Wochen überlebendem, lebertransplantierten Schweines. Ausführung siehe Text Tabelle 9.

ZELLTYP	PROLIFERATION gemessen durch ^{3}H-THYMIDINEINBAU in cpm	
	stimuliert mit PHA	stimuliert mit Con A
R_{PBL}	72 128 ± 10894	23 539 ± 2339
R_{MLZ}	67 105 ± 5540	16 504 ± 1964
R_{LK}	96 002 ± 2370	19 435 ± 1957
R_{LEBER}	3 617 ± 565	17 416 ± 2580

TABELLE 11 Prozentuale Suppression verschiedener MLC-Kombinationen verursacht durch zellteilungsgehemmte Leberzellen eines fünf Wochen überlebenden, lebertransplantierten Schweines. Ausführung und Berechnung der %Suppression siehe Text in Abb. 12.

MLC-KOMBINATION	% SUPPRESSION ZELLEN VON LEBERTRANSPLANTIERTEN TIEREN
SmR_P	0
$SmR_P + (R_{LE})m$	85 ± 6
SmR_M	0
$SmR_M + (R_{LE})m$	83 ± 4
SmR_{LK}	0
$SmR_{LK} + (R_{LE})m$	80 ± 6

4.3 Immunstatus bei nierentransplantierten Patienten

Die Wirksamkeit der medikamentösen Immunsuppression und das Auftreten von Abstoßungsreaktionen bei nierentransplantierten Patienten wird derzeit ausschließlich durch verschiedene Blutwertebestimmungen und Abtasten der Niere ermittelt. Unterstützt durch die enormen Fortschritte in der Immunologie in den letzten Jahren wurden einige Möglichkeiten diskutiert, die Feststellung des Immunstatus mit immunologischen Methoden zu unterstützen bzw. exaktere Daten zu liefern. Spontane Blastogenese, PHA- und Con A-Stimulation von Patientenlymphozyten, T-Zellbestimmungen durch E-Rosetten und spezifische Antikörper sind solche Methoden.

In der vorliegenden Arbeit ist die Tauglichkeit der Anwendung des oben vorgestellten Suppressorzelltestes, von E-Rosetten und spezifischen Antikörper für die Immunstatusfeststellung untersucht worden.

4.3.1 Suppressoraktivität in vitro von peripheren Lymphozyten nierentransplantierter Patienten

Die in die Untersuchung aufgenommenen Patienten unterlagen drei verschiedenen immunsuppressiven Therapien und zwar a) mit einer niedrigen Dosis Steroiden (low dose steroids,LDS), b) LDS in Kombination mit Antithymozytenserum (ATG) und c) LDS kombiniert mit der Gabe von Cyclosporin A. Mit dem in Abbildung 2 dargestellten Test-System wurde über einen längeren Zeitraum die Fähigkeit der isolierten peripheren Lymphozyten zur Generierung von Suppressoraktivität untersucht. Kontrollen wurden mit Lymphozyten zweier Normalpersonen durchgeführt, die keine HLA-Identität aufwiesen. Die Zellen des einen Typs wurden immer als zellteilungsgehemmte Stimulatorzellen, die des anderen Typs immer als Responderzellen in der Differenzierungs- bzw. Test-MLC eingesetzt. Die Diff.-MLC wurde sieben Tage kultiviert, die Zellen danach mit frisch isolierten Stimulator- und Responderzellen zusammen in die Test-MLC eingesetzt

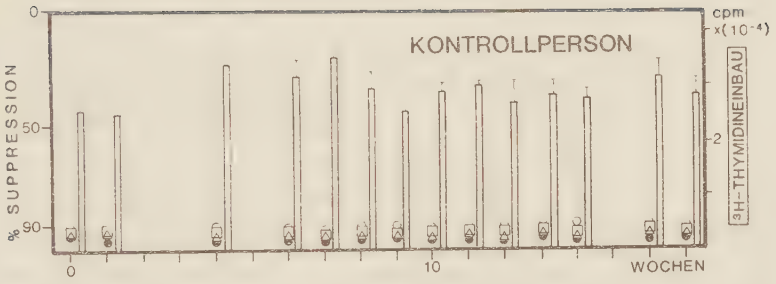

ABBILDUNG 12 In vitro Suppressoraktivierung bei Lymphozyten zweier Normalpersonen. Zellteilungsgehemmte Stimulator- und Responderzellen wurden sieben Tage in einer Differenzierungs-MLC kultiviert, danach zusammen mit frisch isolierten Stimulator- und Responderzellen in der Test-MLC weitere sieben Tage inkubiert. Das Ergebnis ist als %Suppression angegeben mit den Zellverhältnissen (SR)':SmR bei ● 1:2, Δ 1:4, □ 1:8, ○ 1:16. Die Proliferationsraten der Test-MLC ohne Zellen der Diff.-MLC, ausgedrückt durch ^{3}H-Thymidineinbau in cpm, sind durch Säulen dargestellt.

und deren Proliferation am siebten Tag mittels ^{3}H-Thymidineinbau bestimmt. Abbildung 12 zeigt die Fähigkeit zur Suppressorzellaktivierung von peripheren Lymphozyten der beiden Normalpersonen. Es ist zu erkennen, daß die Test-MLC durch Zugabe von Zellen der Diff.-MLC zu ca. 90% in ihrer Proliferation inhibiert wird, dies sowohl bei einem Zellverhältnis Diff.-MLC:Test-MLC wie 1:2 als auch bei den Verhältnissen 1:4, 1:8 und 1:16. Die Säulen in der Abbildung zeigen den ^{3}H-Thymidineinbau in cpm der Test-MLC ohne Zugabe von Zellen der Diff.-MLC.

Bei den Untersuchungen mit Patientenlymphozyten wurden in der Diff.-MLC und Test-MLC Milzzellen des Transplantatspenders, die am Tag der Transplantation eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert wurden, als Stimulatorzellen verwendet. Responderzellen waren die zum jeweiligen Zeitpunkt isolierten Patientenlymphozyten. Die spenderspezifische Stimulierung der Responderzellen wurde in der gemischten Lymphozytenkultur, ebenso wie die Stimulierung durch HLA-inkompatible Stimulatorzellen mittels Messung der Proliferation

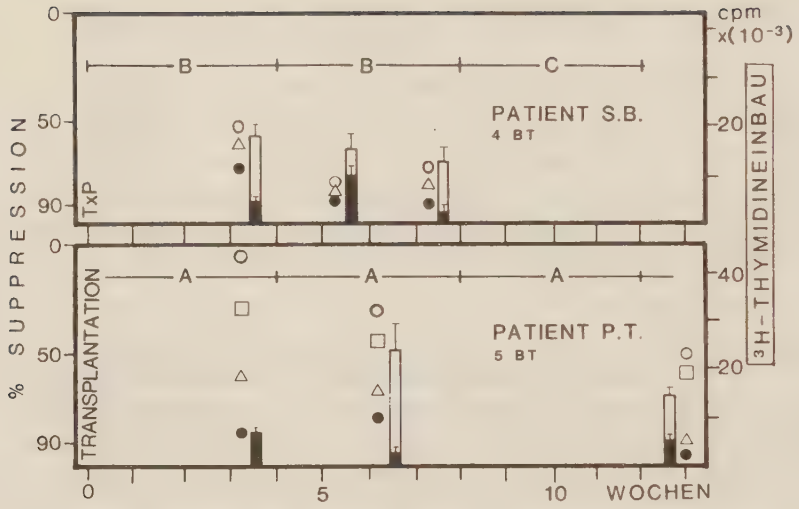

ABBILDUNG 13 In vitro Suppressorzellaktivierung bei LDS immunsupprimierten nierentransplantierten Patienten. Lymphozyten der Nierenspender und -Empfänger wurden als zellteilungsgehemmte Stimulator- bzw. Responderzellen in einer Differenzierungs-MLC (SR)' sieben Tage kultiviert, danach der aus frisch angesetzten Spender- und Empfängerlymphozyten SmR bestehenden Test-MLC in verschiedenen Verhältnissen zugesetzt (s. Abb. 2). Das Ergebnis ist angegeben als %Suppression (s. 3.6.3) mit den Zellverhältnissen (SR)': SmR bei ● 1:2, Δ 1:4, □ 1:8 und ○ 1:16. Die spenderspezifischen Stimulierungen der Empfängerzellen in einer 7-Tage MLC, ausgedrückt durch ^{3}H-Thymidineinbau in cpm, sind durch geschwärzte Säulen, die unspezifischen Stimulierungen (mit phänotypisch HLA-unidentischen Zellen) durch offene Säulen dargestellt. Die Anzahl der präoperativ verabreichten Bluttransfusionen ist jeweils unter den Patienteninitialen aufgeführt.

durch ^{3}H-Thymidineinbau festgestellt. Diese Werte sind in den folgenden Abbildungen als geschwärzte bzw. offene Säulen eingetragen. Im oberen Teil der Abbildungen sind die monatlichen Transplantatsfunktionen der Patienten in vereinfachter Form durch die Buchstaben A, B, C und P gekennzeichnet, wobei A für exzellente Nierenfunktion mit minimaler Immunsuppression, B für gute Nierenfunktion, C für mittelmäßige Nierenfunktion mit gelegentlich auftretenden Abstoßungsreaktionen und P für Nierenfunktion noch vorhanden, aber starke Ab-

stoßungsreaktionen steht. Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse der mit LDS allein therapierten Patienten S.B. und P.T., die vor der Transplantation vier bzw. fünf Bluttransfusionen erhielten. Die untersuchten Lymphozyten zeigten in jedem Fall die Fähigkeit zur Generierung von Suppressoraktivität, wenngleich auch Unterschiede in der Suppressionsstärke gewahr wurden.

Die Ergebnisse der mit LDS und ATG therapierten Patientengruppen zeigen die Abbildungen 14a,b,c. Im oberen Teil der Abbildungen sind die Tage mit ATG-Gaben gekennzeichnet. In den Abbildungen 15a,b sind die Untersuchungsergebnisse der mit LDS und Cyclosporin A therapierten Patienten dargestellt. Wie aus den Abbildungen ersichtlich, zeigen die Lymphozyten der Differenzierungs-MLC meist nach 5 - 6 Wochen die Fähigkeit, Suppressoraktivität von 80 bis 90% auszubilden, während in den ersten postoperativen Wochen meist ein Mangel an Suppressoraktivität festzustellen ist.

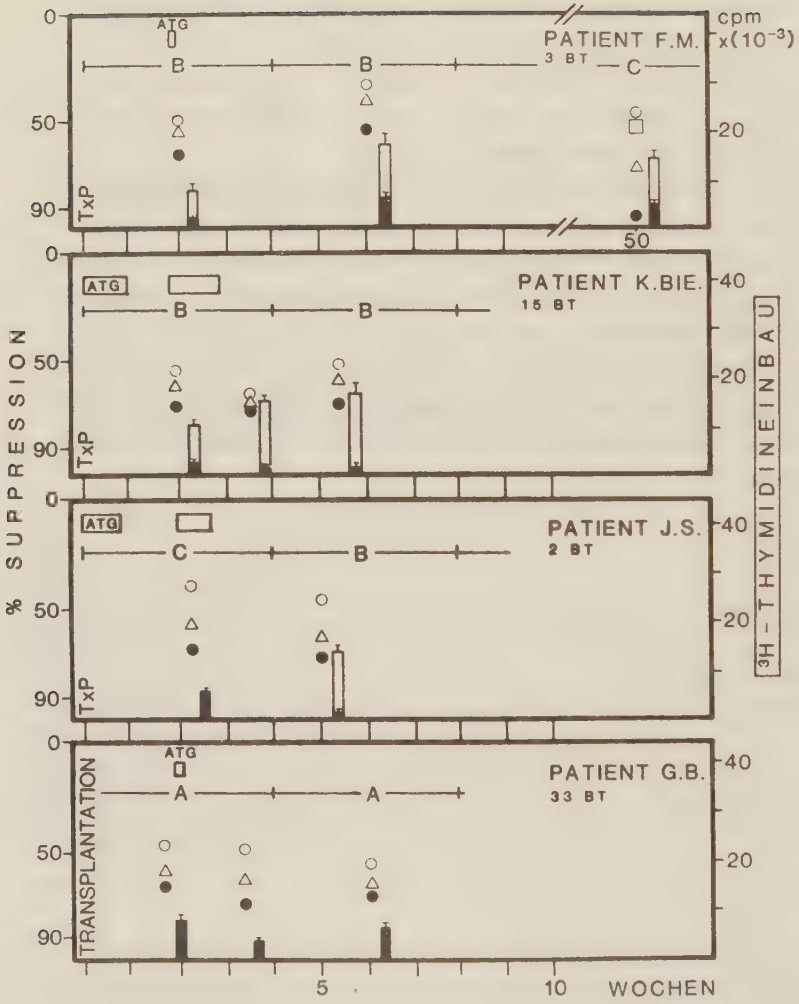

ABBILDUNG 14A In vitro Suppressorzellaktivierung bei Lymphozyten von mit niederen Steroiddosen (LDS) und Antithymozytenglobulin (ATG) immunsupprimierten nierentransplantierten Patienten (weiterer Text siehe Abb. 14c)

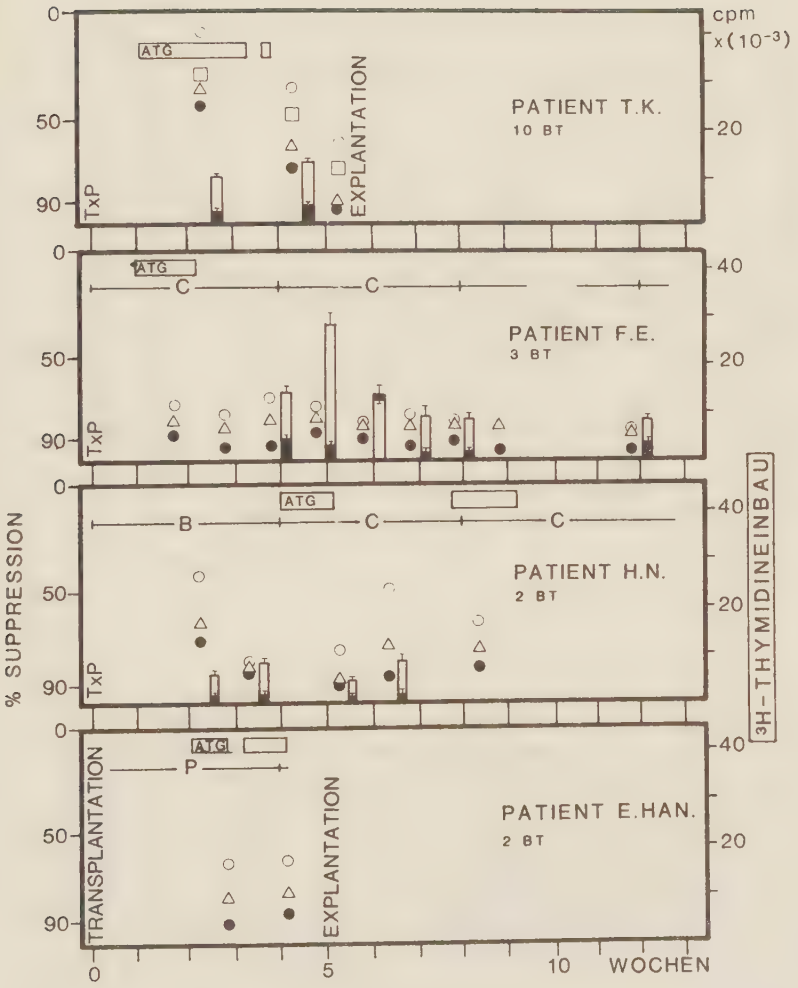

ABBILDUNG 14B In vitro Suppressorzellaktivierung bei Lymphozyten von mit niederen Steroiddosen (LDS) und Antithymozytenglobulin (ATG) immunsupprimierten nierentransplantierten Patienten (weiterer Text siehe Abb. 14c)

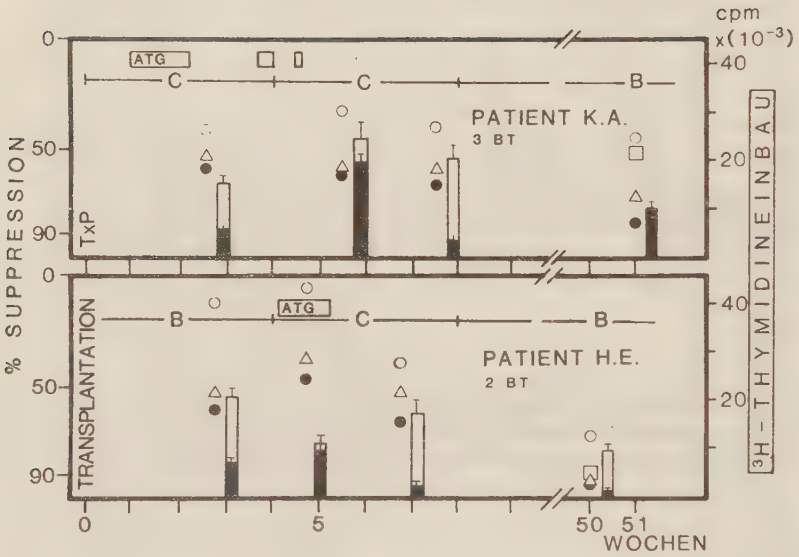

ABBILDUNG 14C In vitro Suppressorzellaktivierung bei LDS und ATG immunsupprimierten nierentransplantierten Patienten. Lymphozyten der Nierenspender und -Empfänger wurden als zellteilungsgehemmte Stimulator- bzw. Responderzellen in einer Differenzierungs-MLC (SR)' sieben Tage kultiviert, danach der aus frisch angesetzten Spender- und Empfängerlymphozyten SmR bestehenden Test-MLC in verschiedenen Verhältnissen zugesetzt (s.Abb.2). Das Ergebnis ist angegeben als %Suppression (s. 3.6.3) mit den Zellverhältnissen (SR)' : SmR bei ● 1:2, Δ 1:4, □ 1:8, ○ 1:16. Die spenderspezifischen Stimulierungen der Empfängerzellen in einer 7-Tage MLC, ausgedrückt durch ^{3}H-Thymidineinbau in cpm, sind durch geschwärzte Säulen, die unspezifischen Stimulierungen (mit phänotypisch HLA-unidentischen Zellen) durch offene Säulen dargestellt. Die Anzahl der prä-operativ verabreichten Bluttransfusionen ist jeweils unter den Patienteninitialen aufgeführt.

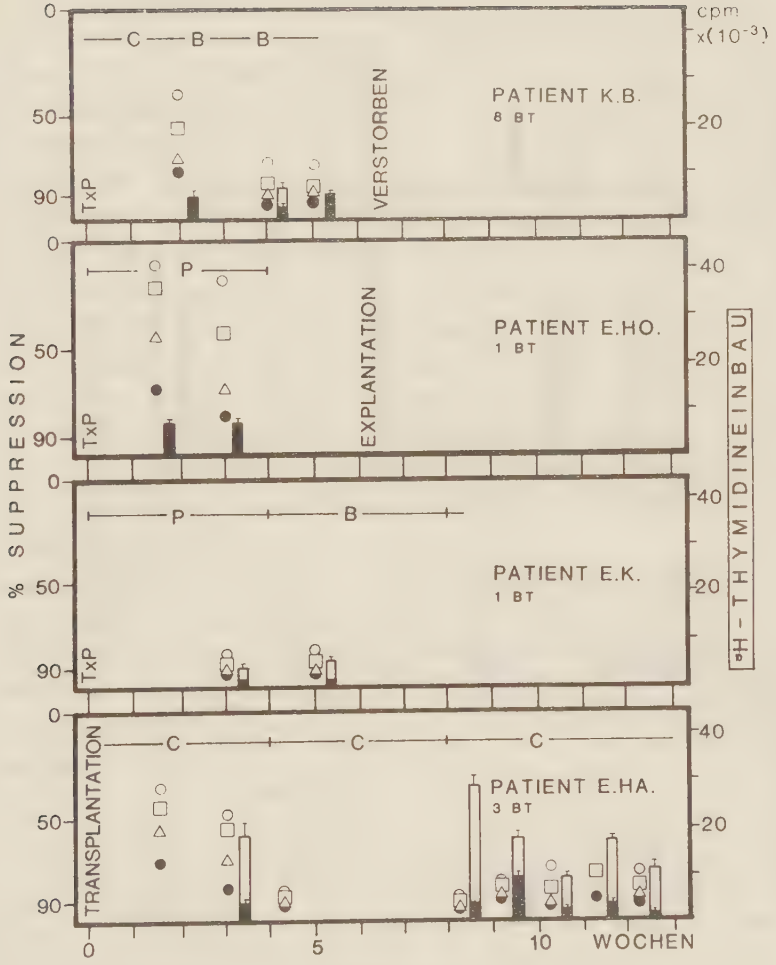

ABBILDUNG 15A In vitro Suppressorzellaktivierung bei LDS und Cyclosporin A immunsupprimierten nierentransplantierten Patienten. Weiteres zur Ausführung siehe Text Abb.14c.

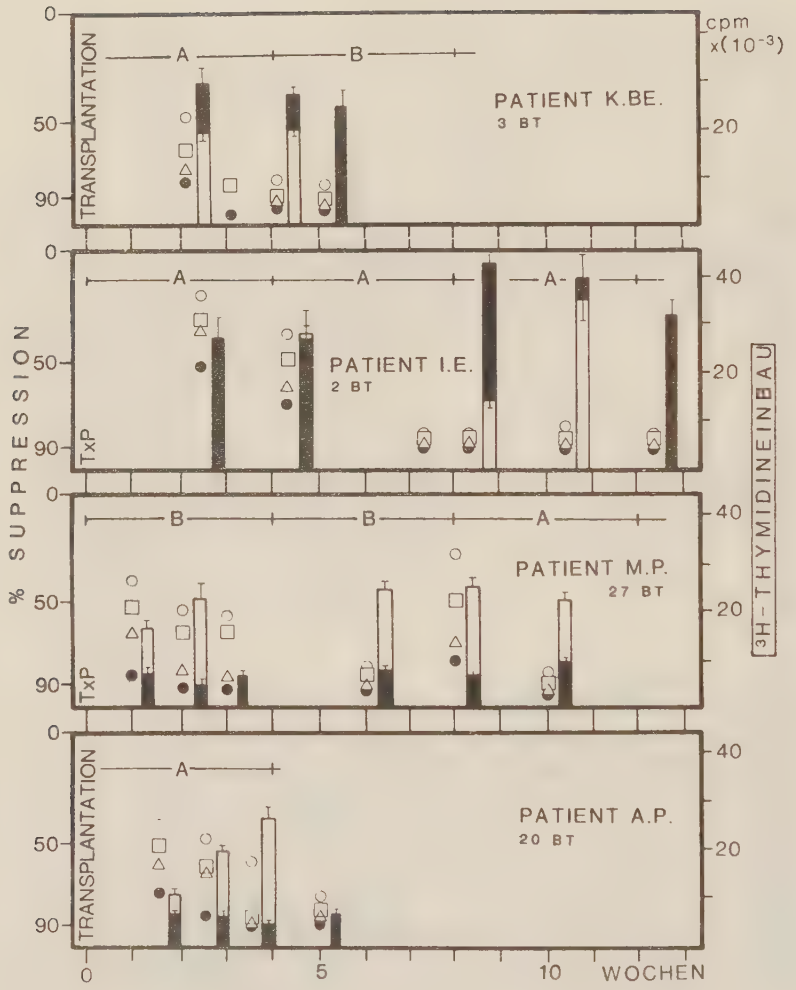

ABBILDUNG 15B In vitro Suppressorzellaktivierung bei LDS und Cyclosporin A immunsupprimierten nierentransplantierten Patienten. Weiteres zur Ausführung siehe Text Abb.14c.

4.3.2 Bestimmung von E-Rosetten

Humane T-Lymphozyten besitzen die Fähigkeit, mittels eines Rezeptors Schafserythrozyten zu binden. Diese Eigenschaft wird seit geraumer Zeit schon benützt, um T-Lymphozyten zu quantifizieren und aus einem Zellgemisch abzutrennen. Um die anstehenden Untersuchungen für die Diaknostik aussagefähig zu machen, wurden die Bindungsbedingungen von Humanlymphozyten an Schafserythrozyten variiert. Dadurch sollten verschiedene T-Zellsubpopulationen erfaßt werden. Mit der Bestimmung der total rosettenbildenden Zellen soll der Gesamt-T-Zellanteil festgestellt werden. Die "aktiv" rosettierenden Zellen sollen Aufschluß über eine T-Zellsubpopulation geben, die bei auftretenden immunologischen Reaktionen in kürzester Zeit aktiviert werden. Die mögliche K-Zellaktivität soll mit den nieder affinen rosettierenden Zellen und hoher ADCC-Aktivität korelliert sein und mit den hoch affinen rosettierenden Zellen sollen jene Zellen erfaßt werden, die aus Thymus, Tonsillen und Lymphknoten stammen und geringe Aktivität in der ADCC zeigen.

Über einen Zeitraum von 6 - 12 Wochen wurden von jeder im Test geführten Person beziehungsw.Patient der prozentuale Anteil der verschiedenen Rosettentypen bestimmt. Als Kontrollpersonen dienten dabei vier Labormitarbeiter, die in dem untersuchten Zeitraum gesund waren, d.h. es waren keine Krankheiten oder Infektionen festgestellt worden.

4.3.2.1 E-Rosettierung mit Lymphozyten der Kontrollpersonen

Dreimal in der Woche, d.h. jeden zweiten bzw. dritten Tag wurden die E-Rosetten bestimmt. Dazu mußten die in der Literatur beschriebenen Methoden im Hinblick darauf variiert werden, daß die im Test geführten Patienten immunsuppressiver Medikation unterstehen und deshalb ihre Lymphozytenzahl stark reduziert ist. Weiter sollte auch gewährleistet sein, die abzunehmende Blutmenge bei den Patien-

ten so gering wie möglich zu halten. In den Vorversuchen wurde gezeigt, daß die Zahlen- und Mengenverhältnisse gegenüber der Literatur (98,99) um die Hälfte reduziert werden konnte, ohne daß signifikante Änderungen der Ergebnisse auftreten (nicht im einzelnen aufgeführt). Für die ersten Untersuchungen wurden käuflich erworbene Schafserythrozyten der Firma Behring und der Firma Sueffer eingesetzt und mit Lymphozyten der Kontrollperson A die Rosettenbildung durchgeführt. Die in acht Wochen erhaltenen Werte zeigen große Abweichungen (Abb. 16, nur aktive und totale T-RFC dargestellt), sowohl bei den einzelnen Rosettenarten als auch bei den Durchschnitts-

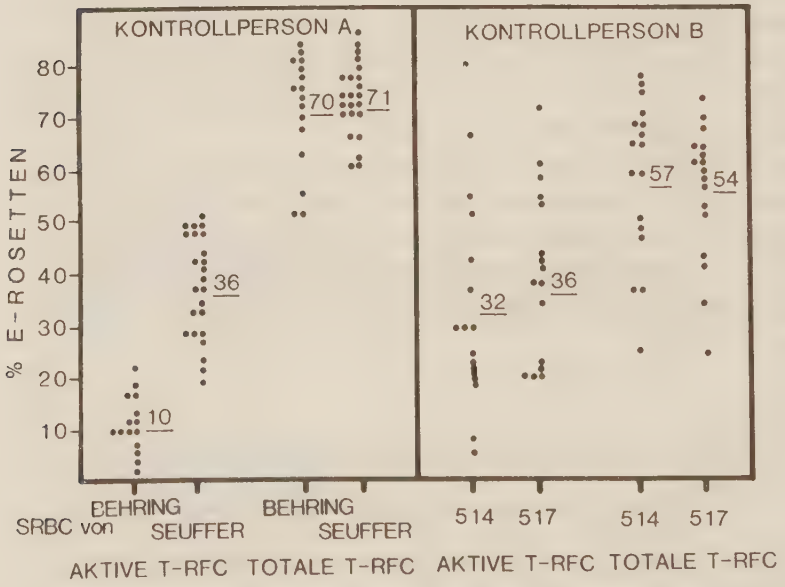

ABBILDUNG 16 Aktive und totale E-Rosettierung mit Lymphozyten der Kontrollpersonen A und B in einem Zeitraum von acht bzw. neun Wochen. Die verwendeten Schafserythrozyten stammten von den Firmen Behring und Seuffer bzw. den Schafen Nr. 514 und Nr. 517 aus eigener Haltung. Die Durchschnittswerte der einzelnen T-Rosettenarten sind im Schaubild unterstrichen.

werten der aktiven T-RFC. Interessant war dabei die Verschiebung der Durchschnittswerte von 10% bei Behring-SRBC zu 36% bei Seuffer-SRBC, wobei die durchschnittliche Zahl der total rosettierenden Zellen mit 70 bzw. 71% nahezu gleich waren.

Die Konsequenz war nun, für die folgenden Untersuchungen Schafserythrozyten zu verwenden, die immer unter gleichen Bedingungen erhalten werden sollten. Zu diesem Zweck wurden von zwei eigens gehaltenen Schafen (Nr. 514 und 517) vierzehntäglich Blut abgenommen und Erythrozytensuspensionen hergestellt (s.3.10.1). Die beiden Schafe hatten während des Untersuchungszeitraumes keine festzustellenden Krankheiten.

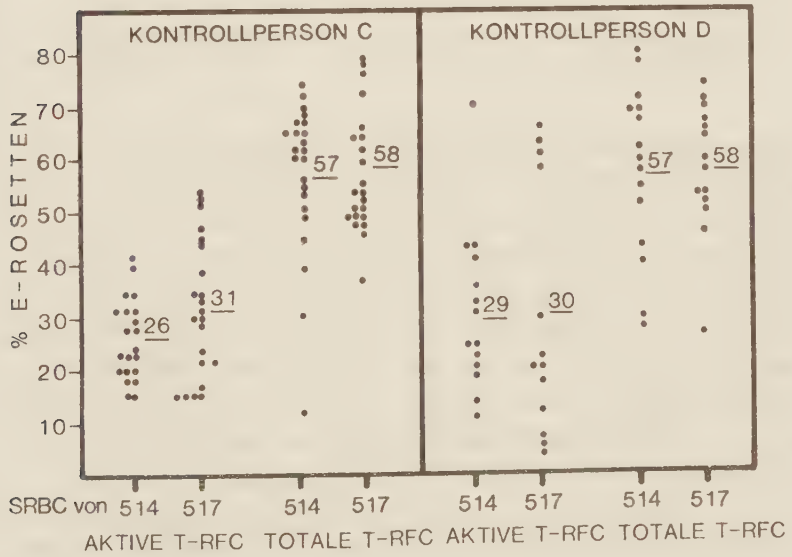

ABBILDUNG 17 Aktive- und totale E-Rosettierung mit Lymphozyten der Kontrollpersonen C und D in einem Zeitraum von elf bzw. acht Wochen. Die verwendeten Schafserythrozyten stammten von den Schafen Nr. 514 und Nr. 517 aus eigener Haltung. Die Durchschnittswerte der einzelnen T-Rosettenarten sind im Schaubild unterstrichen.

Mit diesen Schafserythrozyten wurden die Lymphozyten von dreizehn Patienten und parallel dazu von weiteren drei Kontrollpersonen untersucht. Wie die Abbildungen 16 und 17 zeigen, sind erhebliche Differenzen in den zeitlichen Verläufen der einzelnen Rosettenarten festzustellen (Ergebisse der H- und L-T-RFC sind nicht aufgeführt). In den Abbildungen 16 und 17 ist zu erkennen, daß zwar die Durchschnittswerte der einzelnen Rosettenarten bezüglich der beiden verwendeten Schafserythrozyten keine große Unterschiede aufweisen, die Abweichungen im zeitlichen Verlauf jedoch beträchtlich sind (Abb. 18-20), sowohl mit Erythrozyten vom Schaf 514 als auch vom Schaf 517. Dieser Tatbestand muß auch bei der Bewertung der mit Patientenlymphozyten erhaltenen Werte berücksichtigt werden.

4.3.2.2 E-Rosetten mit Lymphozyten von nierentransplantierten Patienten

Von den dreizehn untersuchten Patienten soll in diesem Rahmen eine Auswahl dreier Zeitverläufe von jeweils aktiv- und total rosettierenden Zellen vorgestellt werden. Die Patienten wurden zur Abstossungsunterdrückung mit Steroiden, Imurek und z.T. noch zusätzlich mit einem Antilymphozytenserum therapiert. Abbildung 21 zeigt den E-Rosetten- und Kreatininverlauf bei Patient G.I. über 60 Tage posttransplant. Am Tag 9 und 15 nach der Transplantation mußte der Patient hämodialysiert werden. Ein ähnliches Bild bezüglich der Rosettenbildung ergab sich bei den weiteren untersuchten Patienten, die nur mit Steroiden und Zytostatika therapiert wurden.

Patient W.K. wurde in den ersten 15 postoperativen Tagen zusätzlich Antilymphozytenserum (ALS) verabreicht. Hier zeigt sich ein gewisser Zusammenhang zwischen Absetzung des ALS und aktiver bzw. totaler Rosettenbildung: Die Anzahl der total rosettierenden Zellen steigt von Tag 15 bis Tag 28 posttransplant kontinuierlich von 47% auf 81%, die aktiv rosettierenden Zellen innerhalb 9 Tagen von ca.

10% auf 48%, um jedoch sofort wieder abzufallen. Umgekehrt verminderte sich das Serumkreatinin von 10mg% am Tag 15 bis auf 1,5 mg% am Tag 35 posttransplant.

Anders sah dies bei dem mit gleichem Schema therapierten Patient Z.K. aus. Das Serumkreatinin betrug 2 Tage nach der Transplantation schon 1 mg%. Dieser Wert änderte sich während des weiteren Untersuchungszeitraumes von 40 Tagen nicht mehr drastisch. Antilymphozytenserum wurde bis 28 Tage nach der Transplantation verabreicht. In der Abbildung 23 sind im Gegensatz zu Abbildung 22 bei Patient W.K. keine direkten oder mittelbaren Zusammenhänge bezüglich E-Rosettierung, Serumkreatinin und Verabreichung von ALS erkennbar.

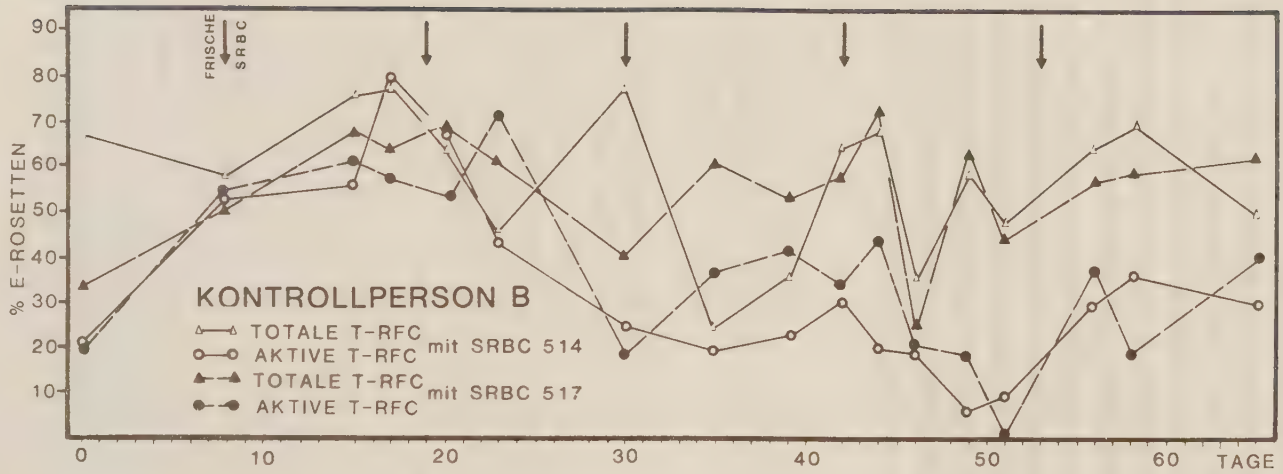

ABBILDUNG 18 Bestimmung der mit Schafserythrozyten aktiv und total rosettierenden T-Lymphozyten von Kontrollperson B. Die Schafserythrozyten wurden aus dem Blut der Schafe Nr. 514 und Nr. 517 isoliert. Die Isolierung der Erythrozyten geschah an den durch die Pfeile im oberen Teil der Abbildung gekennzeichneten Tage.

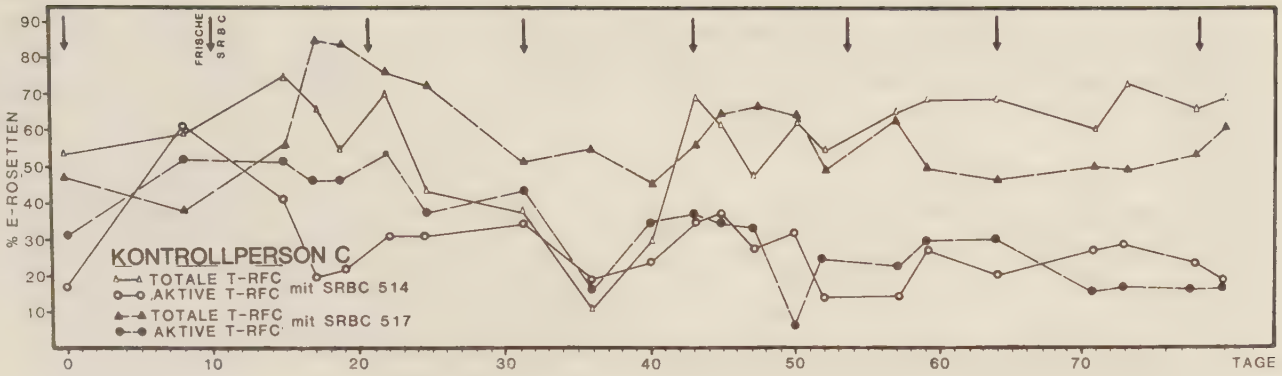

ABBILDUNG 19 Bestimmung der mit Schafserythrozyten aktiv und total rosettierenden T-Lymphozyten von Kontrollperson C. Die Schafserythrozyten wurden aus dem Blut der Schafe Nr. 514 und Nr. 517 isoliert. Die Isolierung der Erythrozyten geschah an den durch die Pfeile im oberen Teil der Abbildung gekennzeichneten Tage.

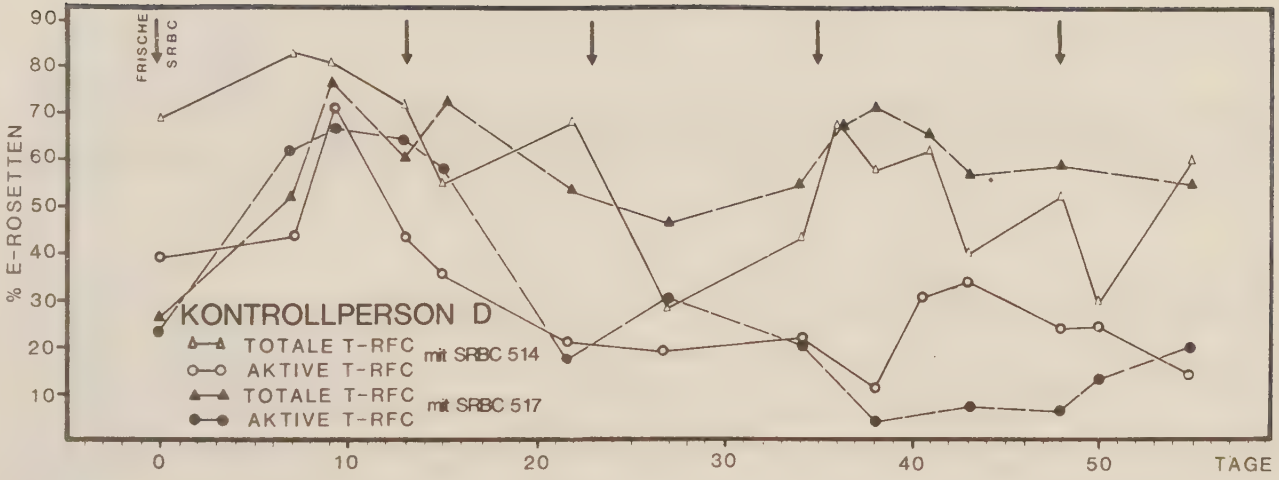

ABBILDUNG 20 Bestimmung der mit Schafserythrozyten aktiv und total rosettierenden T-Lymphozyten von Kontrollperson D. Die Schafserythrozyten wurden aus dem Blut der Schafe Nr. 514 und Nr. 517 isoliert. Die Isolierung der Erythrozyten geschah an den durch die Pfeile im oberen Teil der Abbildung gekennzeichneten Tage.

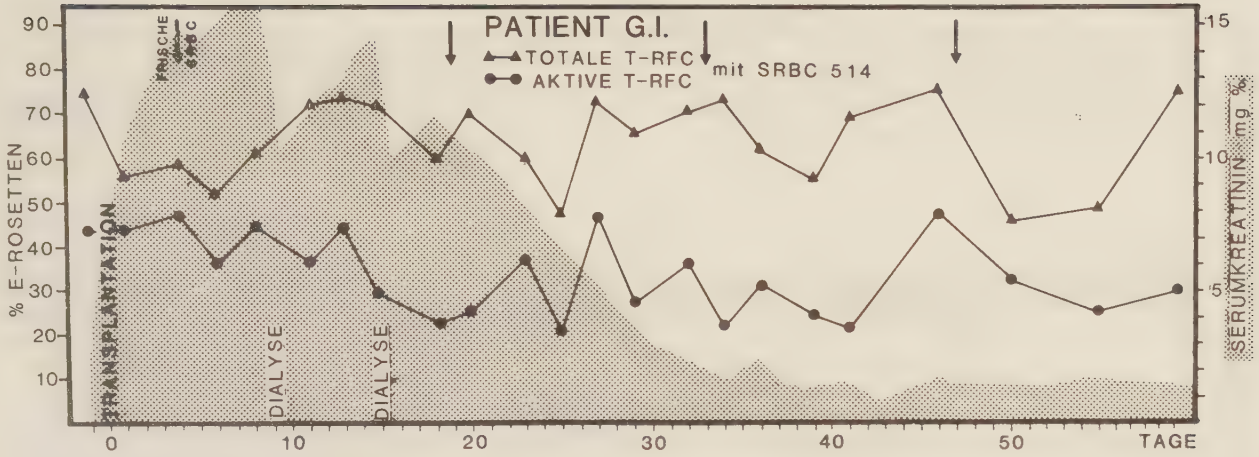

ABBILDUNG 21 Bestimmung der mit Erythrozyten des Schafes Nr. 514 aktiv und total rosettierenden T-Lymphozyten des Patienten G.I. Die Schafserythrozyten wurden an den durch die Pfeile im oberen Teil der Abbildung gekennzeichneten Tagen frisch isoliert. Die punktierte Fläche zeigt den Kreatininverlauf. Am 9. und 15. Tag nach der Transplantation wurde der Patient hämodialysiert.

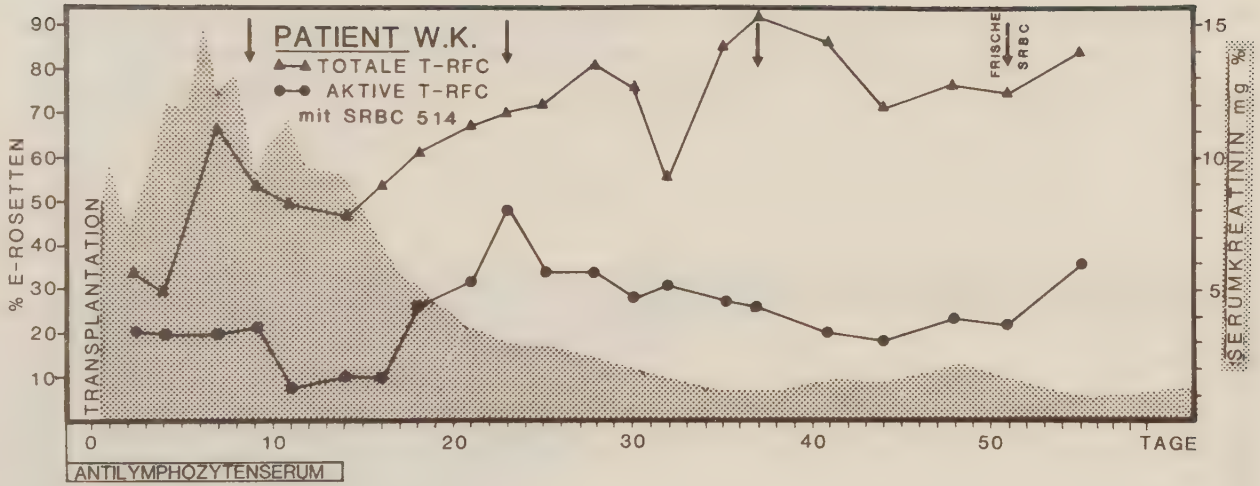

ABBILDUNG 22 Bestimmung der mit Erythrozyten des Schafes Nr. 514 aktiv und total rosettierenden T-Lymphozyten des Patienten W.K. Die Schafserythrozyten wurden an den durch die Pfeile im oberen Teil der Abbildung gekennzeichneten Tagen frisch isoliert. Die punktierte Fläche zeigt den Kreatininverlauf. Bis zum Tag 14 nach der Transplantation wurde der Patient u. a. mit Antithymozytenserum therapiert.

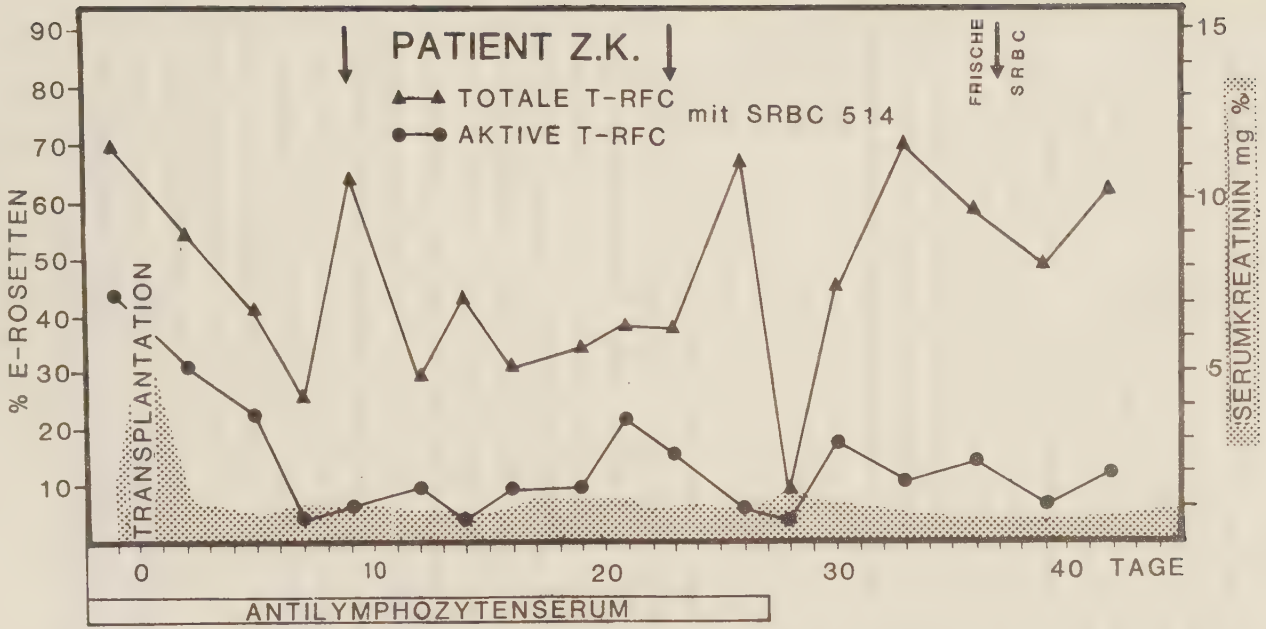

ABBILDUNG 23 Bestimmung der mit Erythrozyten des Schafes Nr. 514 aktiv und total rosettierenden T-Lymphozyten des Patienten Z.K. Die Schafserythrozyten wurden an den durch die Pfeile im oberen Teil der Abbildung gekennzeichneten Tagen frisch isoliert. Die punktierte Fläche zeigt den Kreatininverlauf. Bis zum Tag 27 nach der Transplantation wurde der Patient u.a. mit Antilymphozytenserum therapiert.

5. Diskussion

Die meisten Erkenntnisse über die Wirkung und Funktion von Suppressorzellen wurden hauptsächlich durch Studien am Maus-Modell erhalten. Zwischenzeitlich wird allgemein akzeptiert, daß T-Suppressorzellen eine primäre Rolle in der Immunregulation verschiedener Immunantworten wie Antikörperproduktion (102), Abstoßungsreaktionen (103), verzögerte Überempfindlichkeit (104) und bei der Tumorabwehr (105) ausüben.

Die vorliegende Arbeit befaßte sich in der Hauptsache mit Suppressorzellaktivitätsbestimmungen nach Leber- und Nierentransplantationen am Schwein sowie bei nierentransplantierten Patienten, indem die Methode der gemischten Lymphozytenkultur angewendet wurde.

5.1 Suppressor-Test System

Als Test-System zur Aktivitätsbestimmung von Suppressorzellen wurde eine sogenannte 3-Weg-MLC gewählt. In diesem System wird die Fähigkeit von allogen oder autolog kultivierten Lymphozyten zur Suppressorzelldifferenzierung untersucht, indem diese Zellen zu einer frisch angesetzten MLC gegeben und die dadurch verursachte Proliferationsinhibierung gemessen wurde. Dabei erwies sich, daß nicht nur allogen stimulierte Lymphozyten sondern auch autolog kultivierte Lymphozyten bei Einsatz in eine Test-MLC proliferationshemmend wirken können. Wenngleich auch die Fähigkeit zur Suppressorzelldifferenzierung in einer gemischten Lymphozytenkultur wesentlich stärker vorhanden ist als in einer autologen Lymphozytenkultur. Schon die Zellen einer zwei Tage kultivierten MLC sind in der Lage eine Test-MLC zu 65% in ihrer Proliferation zu inhibieren, wenn das Zellverhältnis 2:1 ist (Abb. 3) und immerhin noch zu 13% bei einem Zellverhältnis von 32:1. Die potenteste Supprimierungsfähigkeit zeigen allogen stimulierte Lymphozyten nach einer Kultivierung von sieben Tagen: Es zeigt sich kaum ein Unterschied in der Supprimierung der Test-MLC bei einem Zellverhältnis von Test-MLC zu Diff.-MLC wie 2:1

bis 32:1. Aus dieser Tatsache ist zu schließen, daß der Supprimierungseffekt von wenigen Zellen verursacht wird. Diese stark ausgeprägte Potenz zur MLC-Suppression ist bei kultivierten autologen Zellen nicht vorhanden. Erstaunlich aber dennoch, daß sieben Tage kultivierte autologe Lymphozyten eine spezifische MLC, das heißt, der kultivierte autologe Zelltyp wird auch als Responder in der gemischten Lymphozytentestkultur eingesetzt, zu 68% in der Proliferation inhibieren können. Nicht in vollem Einklang dazu stehen die auch im Humansystem erarbeiteten Ergebnisse von FULLER et al (87), die die Differenzierungs-MLC zehn Tage kultivierten und im gleichen System in allen Ansätzen geringere Suppressionseigenschaften ermittelten. Die vorliegenden Untersuchungen konnten aber ein Ergebnis von FULLER et al und anderen Gruppen bestätigen (106,107), daß die Zellen der Differenzierungs-MLC nur innerhalb der ersten beiden Tage nach Zugabe zur Test-MLC supprimierend wirken. Dies läßt schließen, daß wahrscheinlich der allogene Erkennungsprozeß der Responderzellen in der Test-MLC durch Zellen der Differenzierungs-MLC unterbunden wird. Da im Überstand der 7-Tage Diff.-MLC kein, die Test-MLC inhibierender Faktor nachgewiesen werden konnte, muß die Blockierung der allogenen Erkennung entweder durch Suppressorzellen direkt oder von ihnen in den ersten beiden Tagen der Test-MLC sezernierten Faktoren ausgehen.

Die Aktivierung der in der Immunregulation wirkenden Suppressorzellen soll nach neuesten Überlegungen (108,109) in "Kaskadenform" geschehen, wobei sich mehrere Suppressorzellsubpopulationen nacheinander durch Suppressorfaktoren aktivieren. MITCHISON (109) beschrieb kürzlich bei der Maus einen solchen Faktor, der von zwei Zelltypen am Ende der Suppressorkaskade produziert wird und supprimierend auf T-Helferzellen wirkt. Im vorliegenden Test-System konnte, wie Tabelle 1 zeigt, ein Suppressorfaktor im Überstand der 7-Tage Test-MLC nachgewiesen werden, der den ^{3}H-Thymidineinbau einer spezifischen MLC (soll heißen: Gleiche Zellkombination wie Diff.- und Test-MLC) inhibieren kann. Der Faktor scheint zu gewissem Grade radioresistent zu sein, während nach Einfrieren bei -20°C die Suppressoreigenschaft verloren geht. Ein weiterer Punkt, der die Funktionalität

eigenschaften war ein weiterer Punkt der Untersuchungen. Einige T-Zellen exprimieren einen für Histamin spezifischen Rezeptor(111). Durch Histaminaktivierung, die nicht von Makrophagen oder von ihnen sezernierten Faktoren gesteuert wird (112), werden in vitro humane T-Lymphozyten und T-Zellen vom Meerschweinchen zur Produktion eines löslichen Suppressorfaktors (HSF) angeregt (113). ROCKLIN et al(114) berichteten über Supprimierung der Proliferation von humanen PHA-induzierten Lymphozyten, verursacht durch histaminaktivierte Lymphozyten. Sie fanden, daß Lymphozyten, in Gegenwart von 0,001 M Histamin für 24 Stunden inkubiert, bei anschließender Co-Kultivierung mit PHA-induzierten Lymphozyten deren Proliferation, bei einem Zellverhältnis von 1:1, zu 32% hemmen. Eine ähnliche Suppressoraktivierung durch Histamin konnte im vorliegenden Suppressor-Test System nachgewiesen werden. Abbildung 7 zeigt die durchschnittlich um 20% erhöhte Suppressorwirkung von 3 und 7 Tage histaminaktivierten Lymphozyten in einer Test-MLC gegenüber nicht aktivierten humanen autologen Lymphozyten. In den Überständen der histaminenthaltenen Lymphozytenkulturen konnten keine Suppressorfaktoren nachgewiesen werden. Wenn, wie schon oben beschrieben, die Suppression durch den HSF vermittelt werden sollte, müßte dieser also erst bei der Co-Kultivierung in der Test-MLC von den histaminaktivierten Zellen sezerniert werden. Daß die Gegenwart von Histamin keinen Einfluß auf die Proliferation einer MLC hat, zeigen die Ergebnisse in Tabelle 4. Der ^{3}H-Thymidineinbau wird durch verschiedene Histaminkonzentrationen nicht signifikant verändert. Dies zeigt, daß die durch Histamin verursachte Suppressorzellaktivierung nicht ausreicht, die Immunantwort in einer gemischten Lymphozytenkultur zu unterbinden. Eine Erklärung dieser Tatsache könnte sein, daß eine erhöhte Suppressorzelldifferenzierung erst nach dem zweiten MLC-Inkubationstag erfolgt und damit keinen Einfluß auf den allogenen Erkennungsprozeß der Zellen hat. Demgegenüber steht das Ergebnis von ROCKLIN et al (114), die ein Maximum an induzierter Suppressorwirkung nach 18-24 Stunden feststellten. Da aber die durch Histaminaktivierung ermittelte Supprimierung in beiden Systemen, sowohl von Rocklin et al als auch die der vorliegenden Arbeit relativ gering war (32 bzw. 20%), könnte es sein, daß

histaminaktivierte Suppressorzellen nur in einem sehr spezifischen Teil der Immunregulation wirken können, so zum Beispiel bei der Produktion von Antikörpern der Ig E-Klasse, aber keinen Einfluß auf die heftige Immunantwort nach allogenem Stimulus haben.

Eine in der Wirkung wesentlich größere Suppressorzellaktivierung ließ sich im vorliegenden Test-System mit Con A-stimulierten Lymphozyten erreichen. Nach 48-stündiger Inkubation in Gegenwart von 25 µg/ml Con A, waren autologe Zellen in der Lage, die Test-MLC fast vollständig zu supprimieren. Auch bei einem Zellverhältnis von Test-MLC zu Con A-aktivierten Lymphozyten wie 32:1 wurde noch eine Suppression von 86% ermittelt. ROCKLIN et al (114) beschrieben eine wesentlich geringere Supprimierung der PHA-induzierten Proliferation, wenn Con A-aktivierte (10 µg/ml) autologe Zellen Co-kultiviert wurden, während SMITH et al (115) ähnliche prozentuale Suppression durch 25 µg/ml Con A-stimulierte Zellen wie im vorliegenden Test-System erhielten. Der Mechanismus,wie die Induktion der Suppressorfunktion bei mitogen-stimulierten Lymphozyten funktioniert, ist nicht bekannt. Wahrscheinlich werden durch Mitogenstimulationen einige physiologische Eigenschaften der Zellen polyspezifisch aktiviert, dies zum Teil dosisabhängig, wie oben ersichtlich.

Die bisherige Diskussion der Ergebnisse zeigt, daß der vorliegende Suppressorzelltest eine gut funktionierende Methode zur in vitro Suppressorzellgenerierung und Nachweis der Suppressoraktivität ist. Auch in der Reproduzierbarkeit ist eine große Konstanz zu verzeichnen, wie dies in Abbildung 12 deutlich wird. Über siebzehn Wochen zeigten im Humansystem die wöchentlichen Werte kaum Unterschiede in der Suppressorzellgenerierung und waren innerhalb der Standartabweichungen gleich jener in Abbildung 3.
Diese Tatsachen, wie auch die Einordnung der erhaltenen Ergebnisse in vorherrschende Meinungen zur Immunregulation weisen das Test-System als relevante Methode zur Suppressorzellaktivitätsbestimmung aus.

5.2 STEX-induzierte Suppressorzellen

Mit Hilfe des Test-Systems konnte der Streptomycetenextrakt auf seine Suppressorzell-induzierende Wirkung untersucht werden. Der Extrakt zeigt gegenüber humanen allogenen Lymphozyten in einer Konzentration von 50 µg/ml einmal eine am dritten Kulturtag sichtbar werdende Inhibierung, zum anderen eine ab dem 5. Kulturtag festzustellende, stimulierende Wirkung (100). Daß in einer mit STEX inkubierten autologen Lymphozytenkultur eine Suppressorzellaktivierung stattfindet, zeigen die in Abbildung 9 dargestellten Ergebnisse. STEX-induzierte Suppressorzellen inhibieren sowohl eine spezifische als auch eine unspezifische Test-MLC Kombination in wesentlich stärkerem Maße als histaminaktivierte Suppressorzellen. Diese Unterschiede sind aber nur zu erkennen, wenn autologe, mit STEX-induzierte Zellen in die Test-MLC gegeben werden. Bei Zugabe von allogenen, mit STEX-induzierten Zellen in die Test-MLC ist eine Aussage über eine signifikante Supprimierungserhöhung, im Gegensatz zu MAIER et al(100), sehr schwierig, da die Kontrolle mit allogenen Lymphozyten schon stark proliferationshemmend auf die Test-MLC wirkt. Eine Ergänzung zu der Arbeit von MAIER et al brachte der Nachweis der T-zellspezifischen STEX-Induktion. B-Zellen und nicht getrennte periphere Lymphozyten proliferieren in 50 µg/ml STEX-Konzentration nur schwach, während bei T-Zellen, mit STEX inkubiert, zwischen dem dritten und sechsten Kulturtag wesentlich größere ^{3}H-Thymidineinbauraten festgestellt wurden. Die fehlende Proliferation von ungetrennten Lymphozyten steht im Widerspruch zu früheren Veröffentlichungen (100,116). Da die Ergebnisse in Abbildung 10 in einem Wiederholungsversuch bestätigt wurden, muß man sie als gegeben betrachten. Eine Suppressorzellaktivierung muß nicht an einen ^{3}H-Thymidineinbau gekoppelt sein, wie die Suppressorversuche mit autologen Zellen bewiesen, die nach mehreren Inkubationstagen zwar eine Test-MLC supprimieren können, aber kein radioaktives Thymidin einbauen. Auch autologe, histaminaktivierte Lymphozyten zeigen keine durch ^{3}H-Thymidineinbau festzustellende Proliferation. Eine Zelldifferenzierung könnte also auch die Erklärung der Suppressorwirkung von STEX-induzierten autologen Lymphozyten

sein. Die Proliferation der von den B-Zellen abgetrennten T-Zellen im Gegensatz zur ungetrennten Population ist schwer erklärbar. Es muß noch untersucht werden, ob STEX-behandelte T- und B-Zellen Suppressoreigenschaften im Test-System aufweisen, und wie sich evt. die Proliferation der STEX-exponierten T-Zellen nach Zugabe am 1.-6. Kulturtag von B-Zellen verändert. Eine Verringerung der Proliferation nach B-Zellzugabe würden die Stimulationsergebnisse bestätigen, aber nicht die Wirkungsweise. Deshalb wäre es zu spekulativ, in diesem Stadium nach einer Erklärung zu suchen.

5.3 Suppressoraktivität nach Lebertransplantation beim Schwein

Bei der allogenen Lebertransplantation am Schwein wird zwar die Induktion einer zellulären Immunantwort festgestellt, das Transplantat wird aber nur gering abgestoßen (60,61). Ein weiteres bekanntes Phänomen ist die durch ein allogenes Lebertransplantat verursachte donorspezifische Immuntoleranz, deren Ursache, nicht wie früher vermutet, in einer durch das Lebertransplantat verursachten generellen immunologischen Hyporeaktivität liegt (117). Unter Berücksichtigung dieser beider Aspekte müssen die vorliegenden Untersuchungen zur Suppressorzellaktivität bei transplantierten Schweinen betrachtet werden. Nach einer Lebertransplantation verändert sich die Fähigleit peripherer Lymphozyten zur Suppressorzellgenerierung nicht in signifikanter Weise. Die, mit dem beschriebenen Suppressortestsystem erhaltenen, in Abbildung 11 dargestellten Ergebnisse, machen dies deutlich. Die Suppressoraktivität von 7-Tage kultivierten Zellen ist bei vier postoperativen Bestimmungen nicht wesentlich verschieden gegenüber den Werten vor der Transplantation. Diese Aussage gilt sowohl für die spezifische als auch für die unspezifische Suppressorzellbestimmung. Da die Tiere keiner Immunsuppression durch Medikamente unterlagen und bei allogenen Schweinetransplantationen nur eine schwache Immunantwort induziert wird, ist dies ein erklärbares Ergebnis: Es wird weder von außen noch innerhalb des

Immunsystems, wenigstens in geringem Maße, Einfluß auf die Zellkooperation der Immunantwort genommen. Ähnlich interpretierbar sind die Ergebnisse zur Cytotoxizität der kultivierten Zellen. Vor und nach der Lebertransplantation ergaben sich keine Veränderungen in der CML-Reaktion. Erstaunlich war nur, daß die kultivierten Suppressorzellen keinen Einfluß auf die Aktivität von cytotoxischen Lymphozyten zeigen. Dies steht im Widerspruch zu den von BERNSTEIN et al (106) im Humansystem erbrachten Ergebnisse, die über eine Verminderung der cytotoxischen Aktivität durch Suppressorzellen berichteten. Die Diskrepanz dieser Aussagen kann augenblicklich nicht erklärt werden.

Bei der Suppressorzellaktivitätsbestimmung in verschiedenen Organen beim Schwein wurde mit einem veränderten Suppressor-Test-System gearbeitet. Es wurden keine Suppressorzellen generiert, sondern die tatsächlich vorhandene Suppressoraktivität bestimmt. Die isolierten Zellen von Milz und Lymphknoten bei nichttransplantierten Schweinen wiesen Suppressoraktivität auf, während die nach einer Lebertransplantation aus denselben Organen isolierte Zellen keine Proliferationssupprimierung der gemischten Lymphozytenkultur zeigten. Andererseits waren bei nierentransplantierten Tieren, deren Transplantat akut abgestoßen wurde, in Milz, Lymphknoten und peripherem Blut Suppressorzellen nachzuweisen. Die Ursachen der donorspezifischen Immuntoleranz sind augenblicklich noch nicht im Detail verstanden. Wichtig für eine lange Transplantatüberlebenszeit ist vor allem die genetische Konstellation des Spender-Empfänger Paares (117) und ein bestimmter Responderstatus des Empfängers (118). Weitere Erklärungsmöglichkeiten ist der Nachweis von MLC-blockierenden Antikörper in Seren lebertransplantierter Schweine und organspezifischer Antikörper (119). Die Möglichkeit der Freisetzung lysosomaler Faktoren durch Zellen des Lebertransplantats, die unspezifisch immunsupprimierend wirken, wird ebenfalls diskutiert (120). Daß der Leber aber eine wichtige Rolle in der Immunregulation zugesprochen werden muß, zeigten die bereits vor Jahren publizierten Versuche von KANTOR und DUMONT (121). Sie stellten fest, daß bei einer Immunisierung via Pfortader eine Immunantwort gegenüber dem Antigen unterbleibt.

Die Erhaltung des portalen Flusses ist sicher ein wichtiges Kriterium zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen, wie dies MÜLLER (122) am Modell der auxiliären Lebertransplantation an der Ratte zeigte: Bei Störung des portalen Flusses wird ein allogenes Lebertransplantat heftig abgestoßen. Da bei lebertransplantierten Schweinen keine Suppressorzellen in Milz, Lymphknoten und peripherem Blut nachzuweisen waren, war die Möglichkeit gegeben, daß in der transplantierten Leber Suppressorzellen rekrutiert werden. Die Wertung dieser Aussage kann augenblicklich noch nicht vorgenommen werden, da, wie Abbildung 12 zeigt, schon in der Leber eines nicht transplantierten Schweines Zellen vorhanden sind, die eine Proliferation von allogen-stimulierten peripheren Lymphozyten desselben Tieres fast vollständig inhibieren können. Unklar ist auch noch, welchen Zelltyp die isolierten Leberzellen vorstellen. Sie wurden zwar durch PHA und Con A mitogen stimuliert, aber nicht in jenem Maße wie periphere Lymphozyten. Auch die isolierten Zellen einer transplantierten Leber zeigen MLC-inhibierende Eigenschaften, und lassen sich mit PHA nicht in dem Maße stimulieren wie Milz-, Lymphknoten- oder periphere Lymphozyten, zeigen aber bei Con A-Stimulation eine ähnliche Proliferationsrate wie bei anderen stimulierten Zellen. Mikroskopisch zeigen die isolierten Zellen größteneils die Morphologie von Lymphozyten, nicht die von Makrophagen. Als nächster Schritt muß sicherlich eine Charakterisierung dieser Zellen durch Adherierungsschritte und Anfärbemethoden folgen. Augenblicklich muß noch davon ausgegangen werden, daß die festgestellte Suppressoraktivität evt. von Makrophagen der Leber, den v. Kupffer'schen Sternzellen, vermittelt wird. Daß eine unspezifische Supprimierung vorliegen kann, deutet das Ergebnis mit den nach der Transplantation isolierten Leberzellen hin. Sie wirken bei Zugabe in die MLC mit peripheren Lymphozyten des Empfängers als Responderzellen proliferationsinhibierend. Wenn die aus der Leber isolierten Zellen nicht von der Leber rekrutiert werden, müßten sie in der oben genannten MLC eigentlich allogen stimulieren. Andererseits wurde von FABRE (123) beschrieben, daß auf Leberzellen hauptsächlich Klasse

I-Antigene exprimiert werden und nur in geringem Maße Klasse II-Antigene. Dies wäre eine mögliche Erklärung der nicht oder nur gering stimulierenden Wirkung der isolierten Leberzellen und der Beobachtung, daß bei Einsatz der Leberzellen als Responder in einer MLC nur geringe Proliferation festgestellt wurde.

5.4 Suppressorzellgenerierung bei nierentransplantierten Patienten

In dem, der Untersuchung zu Grunde liegenden Suppressor Test-System wurde die Fähigkeit von peripheren Blutlymphozyten zur Suppressorzelldifferenzierung in einer gemischten Lymphozytenkultur festgestellt. Es erfolgte also keine Quantifizierung des Suppressorzellanteils oder der Suppressorzellaktivität bezüglich des Blutabnahmetages. Damit ist die generelle Aussage bei Untersuchungen an Patienten auf die Retrospektive beschränkt. Die Durchführung der Suppressorzellgenerierung über sieben Tage und anschließender Aktivitätsbestimmung über weitere sieben Tage ist zwar zeitlich und methodisch aufwendig, aber auf Grund der Voruntersuchungen war diese Testkonstellation gewählt worden, da eine sehr genaue Reproduktion der Ergebnisse erzielt werden konnte. Dies wird in Abbildung 12 deutlich, in der die im Test-System mit Zellen zweier Normalpersonen gemessene Suppressoraktivität über 17 Wochen nahezu gleich ist.

Bei den Suppressoraktivitätsbestimmungen der spenderspezifisch kultivierten Patientenlymphozyten zeigten sich durchweg verminderte Werte in den ersten postoperativen Wochen, zwischen der vierten und sechsten Woche näherte sich die Suppressoraktivität der von Cyclosporin A-therapierten Patienten stammenden, generierten Zellen den "Normalwerten" von ca. 90%, während dies in diesem Maße bei Steroid- und ATG-therapierten Patienten nicht festzustellen war. Die Wirkung von Cyclosporin A in der Immunregulation wurde in jüngster Zeit von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben. POLACIOS und MÖLLER (124) berichteten über eine von Cs-A verursachte Blockierung der T-Zellrezeptoren für Klasse II-Antigene und HESS et al (125) wiesen bei Anwe-

senheit von Cs-A einen Defekt der Aktivierung cytotoxischer T-Zellen nach und konnten keinen Einfluß auf die Aktivierung von Suppressorzellen feststellen. Gut einzuordnen in dieses Bild sind die Ergebnisse von WAGNER (126), der eine, durch Cs-A verursachte Inhibierung der Interleukin 2-Produktion und des "cytotoxischen T-Zelldifferenzierungsfaktors" beschrieb. Weiter stellte er fest, daß bereits aktivierte T-Zellen durch Cs-A nicht in ihrer ausübenden Funktion beeinflußt werden. Cs-A verhindert demnach die Aktivierung der T-Helferzellklone und die Differenzierung cytotoxischer T-Zellen, während T-Suppressorzellen keiner Beeinflussung unterliegen sollen. Diese Wirkungsweise könnte zum Teil die Ergebnisse vorliegender Arbeit erklären. Durch Cs-A wird sie anfänglich verminderte Fähigkeit zur Suppressorzellgenerierung schnell überwunden, da evt. T-Helferzellen durch Blockierung der Rezeptoren für Klasse II-Antigene inaktiv sind und somit das Gleichgewicht bei der MLC-Aktivierung verschoben ist. Da keine Werte von noch nicht transplantierten Dialysepatienten zur Suppressorzellgenerierung vorliegen, kann die Tatsache der nach der Transplantation verminderten Suppressorzellgenerierungsaktivität augenblicklich nicht ausführlich erklärt werden. Die Wirkung des in den ersten 14 Tagen in höheren Dosen verabreichten Steroids muß dabei aber mit berücksichtigt werden, wie auch die Ergebnisse mit Zellen von Patienten zeigen, die mit Prednisolon und Azathioprin allein oder zusätzlich mit ATG therapiert wurden. ATG bewirkt nach THOMAS et al (127) und anderen Arbeitsgruppen eine, durch OKT 4-Antikörper nachgewiesene, Verschiebung des T_H-T_S Zellgleichgewichts im peripheren Blut zugunsten von T-Suppressorzellen, während CARTER et al (128) keinen selektiven Einfluß von Prednisolon und Imuran auf OKT 4 reaktive Zellen feststellten. Antithymozytenglobulin müßte nach diesen Erkenntnissen ähnlich wirken wie Cs-A, was aber mit den vorliegenden Ergebnissen nicht bestätigt werden kann. Bei den meisten der untersuchten Patienten mit ATG-Therapie ist die Fähigkeit zur Suppressorzellgenerierung nicht in dem Maße ausgeprägt wie bei Cs-A-therapierten Patienten. Erst zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt gleichen sich die Werte an. Die Erklärung zur Ursache dieses Effekts könnte evt. eine spezifischere Wirkung von Cs-A in der Immunregula-

tion sein, während ATG evt. auch auf Suppressorvorläuferzellen wirken kann.

Ein weiterer, von mehreren Gruppen beschriebener Tatbestand ist die Korrelation zwischen Suppressoraktivität der nierentransplantierten Patienten und Anzahl verabreichter Bluttransfusionen vor der Transplantation (129). Bei mehr als fünf erhaltenen Bluttransfusionen wurde bei den Patientenlymphozyten eine größere Suppressoraktivität ermittelt, als bei Zellen von Patienten mit weniger Bluttransfusionen. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung läßt sich dagegen eine solche Korrelation nicht signifikant feststellen. Dies ist aber sicherlich auf das angewandte Test-System zurückzuführen, bei dem, wie schon erwähnt, nicht die "aktuelle" Suppressoraktivität der Zellen am Blutabnahmetag ermittelt wird, sondern die Fähigkeit zur in vitro Differenzierung und Aktivierung der Zellen bestimmt wird. Für die weiteren Untersuchungen muß deshalb sicherlich das Test-System dahingehend variiert werden, daß die "aktuelle" Suppressoraktivität bestimmt werden kann. Eine Möglichkeit könnte die Verwendung von eingefrorenen, prä-operativ isolierten Lymphozyten der Patienten sein, die mit den ebenfalls eingefrorenen Spendermilzzellen die "Grund-MLC" bilden. Die aktuelle Suppressoraktivität ließe sich dann aus der evt. Proliferationshemmung dieser Grund-MLC durch Zugabe von frisch isolierten Lymphozyten nach der Transplantation bestimmen. Ein Problem dabei ist sicher die Verwendung der eingefrorenen Patientenlymphozyten als Responderzellen in der MLC, da immer noch nicht hinreichend geklärt worden ist, wie sich eine Zellpopulation beim Einfrieren und Auftauen bezüglich ihrer Subgruppen verhält.

5.5 E-Rosettenbestimmung

T-Zellsubpopulationensbestimmungen mit Hilfe der E-Rosettentechnik wurde als relevante Methode zur prospektiven Immunstatusfeststellung bei nierentransplantierten Patienten beschrieben (98,99,130). Allen Untersuchungen aber war gemeinsam, daß die E-Rosettierung

von Normalpersonenlymphozyten zu wenig Beachtung fand. Auch die Wahl der Schafserythrozyten hatte, wie Abb.16 und 17 beweisen, einen Einfluß auf die E-Rosettenbildung. Drei der getesteten Schafserythrozytenchargen zeigten bei der "aktiven Rosettenbestimmung" mit Lymphozyten von Normalpersonen annähernd gleiche Durchschnittswerte (36,36,32,26,31,29 und 30%) und waren auch ähnlich dem von KERMAN und GEIS (98) ermittelten Wert mit 27%. Mit den von Behring käuflich erworbenen Schafserythrozyten wurde aber ein Durchschnittswert von 10% festgestellt. Wenn zudem der zeitliche Verlauf der Rosettenbestimmung betrachtet wird, was ja ausschlaggebend bei der Bewertung von E-Rosetten bei Patienten ist, wird deutlich, daß sich der Durchschnittswert aus einer relativ stark schwankenden Kurve zusammensetzt (Abb. 18,19,20). Bei den Total rosettierenden Zellen von Normalpersonen ist es ähnlich. KERMAN und GEIS ermittelten einen durchschnittlichen Wert von 65%. Bei den vier untersuchten Normalpersonen der vorliegenden Arbeit zeigen sich zwar bei Verwendung der Erythrozyten von Schaf Nr. 514 und 517 nahezu gleiche Durchschnittswerte (Abb.17), die Schwankungsbreiten der Verlaufskurven waren aber jeweils groß. Mit Schafserythrozyten von zwei anderen Quellen wurden höhere Durchschnittswerte, bei gleichbleibender Schwankunsbreite, ermittelt. Da alle Untersuchungen mit standartisierten Methoden und immer bei gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, muß man einen methodischen Fehler ausschließen. Auch der lange Untersuchungszeitraum von 60 - 70 Tagen trägt zur Relevanz der Ergebnisse bei. Mit dieser Voraussetzung muß die Wertung der rosettierenden Zellen bei den Patienten vorgenommen werden. Aus der Gruppe der mit Decortin und Imurek therapierten Patienten wurde die Verlaufskurve der E-rosettierenden Zellen von Patient G.I. im Ergebnisteil vorgestellt, da die Untersuchung der anderen neun Patienten dieser Gruppe zu ähnlichen Verläufen führte. Es ergaben sich keine Möglichkeiten zur Korrelation klinischer Daten mit dem Verlauf der rosettierenden Zellen, vor allen Dingen unter Berücksichtigung der Rosettenbildung von Normalpersonenlymphozyten. Weder Kreatininverlauf noch auftretende Abstoßungsreaktionen konnten durch signifikante Änderungen der E-Rosettierungen korreliert werden,

wie dies beschrieben wurde (130). Bei einem Patienten der neben Imurek und Decortin mit Antilymphozytenserum (ALS) therapiert wurde, ließ sich dagegen ein Zusammenhang zwischen Absetzung der ALS-Gabe und Anstieg der aktiv und total rosettierenden Zellen nachweisen (Patient W.K.). Andererseits ist bei dem Verlauf von Patient Z.K., der ebenfalls mit ALS behandelt wurde, keine oben beschriebene Abhängigkeit erkennbar. Es erfolgt nach Absetzung von ALS kein signifikanter Anstieg der total rosettierenden Zellen, wie dies zu erwarten gewesen wäre.

Die Relevanz der E-Rosettierung von peripheren Lymphozyten nierentransplantierter Patienten als Beitrag zur Feststellung des Immunstatus bzw. Vorhersage von Abstoßungsreaktionen muß unter Voraussetzung und Einbeziehung der erhaltenen Ergebnisse mit verschiedenen Schafserythrozyten und mehreren Normalpersonen als nicht gegeben betrachtet werden. Eine weitere Methode zur T-Zellsubpopulationsbestimmung erwies sich bei den Voruntersuchungen als nicht brauchbar (Ergebnisse nicht vorgestellt). Mit Hilfe selbst radioaktivmarkierter Antikörper sollten T-Zellsubpopulationen bestimmt werden. Voraussetzung zur Anwendung dieser Methode mußte eine hohe Reproduzierbarkeit der radioaktiven Markierungen sein, da aus der gemessenen Radioaktivität auf Vorhandensein von Antikörpern geschlossen wird, Jodmarkierung müssen aber wegen der geringen Halbwertszeit des Isotops ca. 14-täglich vorgenommen werden. Es konnten bei den Vorversuchen keine Ergebnisse erzielt werden, die es rechtfertigt hätten, die Methode zur Bestimmung von T-Zellsubpopulationen bei Patienten als Verlaufskontrolle anzuwenden. Zumal seit kurzem die Bestimmung von Zellen durch fluoreszenzaktivierte Antikörper standartisiert wurde, wobei die auftretende Fluoreszenz durch ein spezielles Gerät (FACS) leicht und vor allem reproduzierbar gemessen wird (131).

6. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe des der Arbeit zugrunde liegenden Suppressor-Test-Systems konnte die Aktivität von spezifischen, unspezifischen, radioresistenten und radiosensitiven Suppressorzellen bestimmt und der Nachweis eines Suppressorfaktors erbracht werden. Der Beweis zur Funktionalität des Test-Systems wurde durch die Wirkung von Interleukin 2, Con A- und histaminstimulierten Lymphozyten erbracht.

An nicht immunsupprimierten lebertransplantierten Schweinen konnte gezeigt werden, daß sich die Fähigkeit zur in vitro Suppressorzellgenerierung von peripheren Lymphozyten nach der Transplantation nicht verändert gegenüber den prä-operativen Werten. Bei Milzzellen, Lymphknotenzellen und Lymphozyten aus peripherem Blut wurde nach einer Lebertransplantation dagegen keine Suppressoreigenschaften, im Gegensatz zu Zellen von nichttransplantierten- und nierentransplantierten Tieren, nachgewiesen. Aus einer nicht transplantierten und einer transplantierten Leber wurden bisher nocht nicht näher charakterisierte Zellen isoliert, die in vitro Suppressoraktivität aufweisen und von PHA und Con A stimuliert werden.

Lymphozyten von nierentransplantierten Patienten zeigen eine verminderte Fähigkeit zur in vitro Suppressorzellgenerierung. Bei Zellen von Cyclosporin A-therapierten Patienten ist eine Annäherung der generierten Suppressoraktivität an die bei Normalpersonen erhaltenen Werte, beobachtet worden, während dies bei Zellen von ATG-therapierten Patienten nicht feststellbar war.

Die T-Zellsubpopulationsbestimmung bei nierentransplantierten Patienten durch E-Rosetten ist für eine prospektive Anwendung nicht geeignet, da in den Untersuchungen mit Zellen von Normalpersonen große Schwankungen der prozentualen E-Rosettierungen festgestellt wurden und so eine definitive Aussage über die verschiedenen T-Zellanteile bei Patienten beeinträchtigt war. Ein selbstentwickelter Radioimmunoassay,der auch zur prospektiven T-Zellbestimmung angewendet werden sollte, erwies sich auf Grund seiner geringen Reproduzierbarkeit, das mit der radioaktiven Markierung der Antikörper zusammenhing, als zur Anwendung nicht geeignet.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Harboe,M., J.B. Natvig (1981)
Medizinische Immunologie
Enke Verlag Stuttgart

2. Roitt, J. (1980)
Essential immunology
Blackwell scientific publikations, Oxford

3. Bier, Götze, Mota, Dias da Silva (1978)
Experimentielle und klinische Immunologie
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York

4. Klein, J. (1975)
Biology of the mouse histocompatibility-2 complex
Springer Verlag

5. Matzinger, P., R. Zamoyska (1982)
A beginners guide to major histocompatibility complex function
Nature, 297, 628

6. Robertson, M. (1982)
The evolutionary part of the major histocompatibility complex and the future of cellular immunology
Nature 297, 629 - 632

7. Toose, J. (1973)
The molecularbiology of tumour viruses
Cold Spring Harbor Lab.

8. Mitchison, N.A. (1969)
The immunogenic capacity of antigen taken up by peritoneal exsudate cells
Immunology 16, 1 - 14

9. Schmidke, J.R., E.R. Unanue (1971)
Macrophageantigen interaction: uptake, metabolism and immunogenecity of foreign albumin
J. Immunol. 107, 331 - 338

10. Spitznagel, J.K., A.C. Allison (1970)
Made of action of adjuvants: effects of antibody responses to macrophage-assoziated bovine serum albumin
J. Immunol. 104, 128 - 139

11. Rosenthal, A.S. (1978)
Determinant selection and macrophage function in genetic control of the immune response
Immunol. Rev. 40, 136 - 152

12. Gery, J. R.E. Handschumacher (1974)
Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens
II. Properties of the mediator(s) from adherent cells
Cell. Immunol. 11, 162 - 169

13. Koopman, W.J., J.J. Farrar, J.Fuller-Bonar (1978)
Evidence for the identification of lymphocyte activating factors as the adherent cell derived mediator responsible for enhanced antibody synthesis by nude mouse spleen cell
Cell. Immunol. 35, 92 - 98

14. Wood, D.D. (1979)
Mechanism of action of human B-cell activating factor. I.Comparison of the phaque-stimulating activity with thymocyte-stimulating activity
J. Immunol. 123, 2400 - 2407

15. Smith, R.T., M. Norcross, V.Maino, Y.Konaka (1980)
Helper mechanism in T cell activation
Immunol. Rev. 51, 193 - 214

16. Plate, J.M.D. (1976)
Soluble factors substitute for T-T cell collaboration in generation of T-killer lymphocytes
Nature 260, 329 - 331

17. Morgan, D.A., F.W. Rucetti, R.C. Gallo (1976)
Selective in vitro growth of T-lymphocytes from normal human bone marrows
Science 193, 1007 - 1008

18. Gillis, S., K.A. Smith (1977)
Long term culture of tumour specific cytotoxic T-cells
Nature 268, 154 - 156

19. Wagner, H., M.Röllinghoff (1978)
T-T cell interactions during in vitro cytotoxic allograft responses I. Soluble products from activated Ly 1+ T cells trigger autonomously antigen primed Ly 23+ T cells to cell proliferation and cytolytc activity
J. Exp. Med. 148, 1523 - 1538

20. Wagner, H. (1973)
Synergy during in vitro cytoxic allograft responses I. Evidence for cell interaction between thymocytes and peripheral T cells
J. Exp. Med. 138, 1379 -1397

21. Wagner, H. C.Hardt, K. Heeg, K. Pfitzenmaier, W.Solbach, R.Bartlett, H.Stockinger, M. Röllinghoff
T-T cell interaction during cytotoxic T-lymphocytes (CTL) responses: T cell derived helper factor (IL-2) as a probe to analyze CTL responsiveness and thymic maturation of CTL progenitor
Immunol. Rev. 51, 215 - 255

22. Wagner, H. et al (1980)
Behring Inst. Mitt. 67

23. Zinkernagel, R.M., P.C. Doherty (1979)
MHC-restricted cytotoxic T cells: Studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T cell restriction specifity function and responsivness
Adv. Immunol. 27, 51 - 177

24. Doherty,P., R.Zinkernagel (1975)
H-2 compatibility is required for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic Choriomeningitis Virus
J. Exp. Med. 141, 502 -507

25. Zinkernagel,R.M., P.C. Doherty (1974)
Restriction of in vitro T-cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis with in a syngeneic or semi allogeneic system
Nature 248, 701 - 702

26. Persson,V., L.Hammarström, E.Möller, G.Möller, C.T.E.Smith(1978)
The role of adherent cells in B lymphocyte activation
Immunol. Rev. 40, 78 - 101

27. Bretscher,P. M.Cohn (1970)
The theory of self - non self discrimination
Science 169, 1042 - 1055

28. Couthinho, A. , G.Möller (1974)
Immune activation of B cells: evidence for one none specific triggering signal not delivered by Ig-receptors
Scand. J. Immunol. 3, 133 - 141

29. Andersson,J., F.Melchers
T cell dependent activation of resting B cells: Requirement for both nonspecific unrestricted and antigenspecific Ia-restricted soluble factors
Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 4, 2497 - 2501

30. Burnett, F.M. (1959)
The clonal selection theory of acquired immunity
Cambridge University press

31. Melchers,F., J. Anderson, W.Zenhardt, M.Schreier (1980)
Roles of surface-bound immunoglobulin molecules in regulating the replication and maturation to immunglobulin secretion of B-lymphocytes
Immunol. Rev. 52, 89 - 114

32. Jerne,N.K. (1971)
The somatic generation of immune recognition
Eur. J. Immunol. 1, 1 - 9

33. Gershon,R.K., K. Kondo, (1970)
Cell interactions in the generation of tolerance: the role of thymic lymphocytes
Immunol. 18, 723 - 737

34. Gershon,R.K. (1975)
A disquisition on Suppressor T cells
Transpl. Rev. 26, 170 - 185

35. Dutton, R.W. (1975)
Suppressor T cells
Transpl. Rev. 26, 39 - 55

36. Basten,A., J.P.Miller, J.Sprent, C.Cheers (1974)
Cell to cell interaction in the immune response. X. T cell dependent suppression in tolerant mice
J. Exp. Med. 140, 199 - 217

37. Kölsch,E., R.Stumpf, G.Weber (1975)
Low zone tolerance and suppressor T cells
Transpl. Rev. 26, 56 - 105

38. Folch,H., B.H. Waksmann (1974)
The spleenic suppressor cell I. Activity of thymus dependent adherent cells: changes with ages and stress
J. Immunol. 113, 127 -139

39. Gershon, R.K., E.M. Lance, K.Kondo (1974)
Immunoregulatory role of spleen localizing thymocytes
J. Immunol. 112, 546 - 554

40. Tada,T., M.Tanigudi, T.Takemori (1975)
Properties of primed suppressor T cells and their products
Transpl. Rev. 26, 106 - 129

41. Pichlmayr,R. (1981)
Transplantationschirurgie
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York

42. Baronio, G. (1804)
Degli innesti animali stamperia e fonderia del genio
Mailand

43. Loebl, L. (1908)
Über die Entstehung eines Sarkoms nach Transplantation eines Adenocarcinoms einer japanischen Maus
Krebsforsch. 7, 1883 - 1886

44. Tyzzer, E. (1909)
A study of inheritance in mice with reference to their susceptibility to transplantable tumours
J. Med. Res. 21, 519 - 573

45. Gorer, P.A. (1936)
The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera
Br. J. Exp. Pathol. 17, 42 - 50

46. Snell, G.D. (1948)
Methods for the study of histocompatibility genes
J. Genetics 49, 87 - 108

47. Medawar, P.D. (1944)
The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits
J. Anat. 78, 176 - 199

48. Dausset, J. (1958)
Iso-leuco anticorps
Acta Haemat. (Basel) 20, 156

49. Köhler, G., C.Milstein (1975)
Continous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specifity
Nature 256, 495 - 497

50. Welsh,K.S., H. Burgos, J.R. Batchelor (1977)
The immune response to allogeneic rat platelets: Ag B antigens in matrix from lacking Ia
Eur. J. Immunol. 7, 267 - 272

51. Lafferty,K.J., J.S.Misko, M.A.Cooley (1974)
Allogeneic Stimulation modulates the in vitro response of T cells to transplantation antigen
Nature 249, 275

52. Bach,F.H., M.L.Bach, P.M.Sondel (1976)
Differential function of major histocompatibility complex antigens in T-lymphocyte activation
Nature 259, 273 - 281

53. Schilfgaarde, R.van, P. Hermans, J.L.Terpsta, P.J.C.Breda (1980)
Role of mobile passenger leukocytes in the rejection of renal

and cardiac allografts in the rat
Transpl. 29, 209 - 213

54. Lafferty,K.J., J. Noolmough (1977)
The origin and mechanism of the allograft reaction
Immunol. Rev. 35, 231

55. Steinmann,R.M., M.D.Witmar (1978)
Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed lymphocyte reaction in mice
Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 5132 - 5136

56. Stingl,G., S.I.Katz, C.Clement, J.Green, E.M.Shevach (1978)
Immunologic functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells
J. Immunol. 121, 2005 - 2013

57. Nakashima,J., P.Lake (1979)
A novel subset of antigenic cells triggers B-cell responses to MHC antigens
Nature 279, 716 - 718

58. Mitchison,N.A. (1979)
Regulatory circuits initiated ba highly specialised antigen-presenting cells: the lesson for transplantation
Behring Inst. Mitt. 63, 52 - 55

59. Zimmermann,F.A., G.W.Butcher, H.S.Davies, G.Brons, N.Kamada, O.Türel (1979)
Techniques for orthotopic liver transplantation in the rat and some studies of the immunologic responses to fully allogeneic liver grafts
Transplant. Proc. II, 571 - 577

60. Calne,R.Y. (1976)
Mechanism in the acceptance of organ grafts
Br. Med. Bull. 32, 107 - 112

61. Bockhorn,H. (1981)
Die allogene Lebertransplantation
Res. Exp. Med. 178, 79 - 101

62. Barker,C.F., R.F. Billingham (1977)
Immunologically privileged sites
Adv. Immunol. 25, 1 - 54

63. Bach,J.F. (1975)
The mode of action of immunosuppressive agents.
In: Neuberger,A., A.L.Tatum (edv) North-Holland

64. Skinner,M.D., R.S. Schwartz (1972)
Immunsuppressivetherapy
N. Engl. J. Med. 287, 221, 281

65. Thomas,F., J.G.Mendez, R.Lower, H.M.Lee (1977)
Differential effects of immunosuppressive drugs on Human T, B and K lymphocytes
Transpl. 24, 6

66. Calne,R.Y. (1979)
Immunosuppression for organ grafting-observations on Cs A
Immunol. Rev. 46, 113 - 124

67. Brent,L. C.G.Brooks, P.B.Medawar, E.Simpson (1976)
Transplantation tolerance
Br. Med. Bull 33, 101 - 106

68. Binz,H., Wigzell (1975)
Shared idiotypic determinants on B and T lymphocytes reactive against the same antigenic determinants. I. Demonstration of similar or identical isiotyps on IgG molecules and T-cell receptors with specifity for the same alloantigens
J. Exp. Med. 142, 197 - 211

69. Jerne;N.K. (1974)
Towards a network theory of the immune system
Ann. Immunol. 125, c, 373 - 389

70. Starzl,T.E., K.A.Porter, C.W.Putmann, G.P.J. Schröter, C.G.Halgrinson, R.Weie, M.Hölscher, H.A.S.Heid (1976)
Orthotopic liver transplantation in ninety-three patients
Surg. Gynecol. Obstet. 148, 487 - 505

71. Mandel,M.A., A.P.Monaco, P.S.Russell (1965)
Destruction of spleenic transplantation antigens by a factor present in the liver
J. Immunol. 95, 673 - 682

72. Owen,E.R. (1969)
Preventing the rejection of transplanted organs
Ann. Roy. Coll. Surg. Engl. 45, 63 -68

73. Bockhorn,H., R.Pichlmayr (1978)
Die Rolle der LD-Antigene bei der allogenen Schweineleber-transplantation
Langenbecks Arch. Chir. (Suppl.) 307 - 311

74. Böyum,A. (1968)
Separation of leukocytes from blood and bone marrow
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21, Suppl. 97, 31

75. Perlmann,H., P.Perlmann, G.R.Pape, G.Halden (1976)
Purification, fractionation and assay of antibody-dependent lymphocytic effector cells (K-cells) in human blood
Scand. J. Immunol. 5, Suppl. 5

76. Osoba,D., J.Falk, M.Dajko, J.A.Richardson (1975)
A simple freezing and storage method to preserve the stimulating function of leukocytes in the mixed leukocyte reaction
Tissue Antigens 5, 226

77. Joyce,M., H.Bach (1978)
Sensizitation of lymphocytes against pooled allogeneic cells I. Generation of cytotoxicity against autologous human lymphoblastoid cell lines
J. Exp. Med. 145, 1334 - 1340

78. Julius,M.H., E.Simpson, H.A.Herzenberg (1973)
A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes
Eur. J. Immunol. 3, 645

79. Henry,C., Y.U.Chen, R.Stout, S.L.Swain (1976)
Nylonwool In: Selected methods in cellulär immunology ed by A.A.Mishell, St. M. Shiigi

80. Mempel,W., H.Grosse-Wilde, P.Baumann, B.Netzel, I.Steinbauer, S.Scholz, J.Bertrames, E.D.Albert (1973)
Population genetics of the MLC response: Typing for MLC determinants by using homozygous and heterozygous reference cells
Transpl. Proc. 5, 1529 - 1538

81. Bach,F.H., K.Hirschhorn (1964)
Lymphocyte interaction: A potential histocompatibility test in vitro
Science 143, 813 - 814

82. Bain,B., M.R.Vas, L.Löwenstein
A reaction between leukocytes in mixed peripheral blood culture
Fed. Proc. 22, 429

83. Han,T., G.E.Moore, J.E.Sokal (1971)
In vitro lymphocyte response to autologous cultered lymphoid cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 136, 976

84. Weksler,M.E., G.Birnbaum (1972)
Lymphocyte transformation induced by autologous cells: Stimulation by cultered lymphoblast lines
J. Clin. Invest. 51, 3124

85. Svedmyr,E.A., F.Deinhardt, G.Klein (1974)
Sensitivity of different target cells to the killing action of peripheral lymphocyte stimulated by autologous lymphoblastoid cell lines
Int. J. Cancer 13, 891

86. Dausset,J. (1976)
Kinetics and specifity of the secondary MCR and CML
Transpl. Proc. 8, 3

87. Fuller,L., G.Kyriadides, C.Klan, V.Esquenazi, J.Miller (1980)
In vitro generation of human mixed lymphocyte culture suppressor cells
Transplantation 29, 1

88. Bonnard,G.D., L.Lemos, M.Chappnis (1974)
Cell mediated lympholysis after sensitization in unidirectional mixed lymphocyte culture in man
Immunol. 3, 97 - 106

89. Martinis,J., F.H.Bach (1978)
HLA CD Antigen crossmatching - The pool cell-mediated lympholysis Test
Transpl. 25, 1, 39

90. Albrechtsen,D., E.Arnesen, E.Thorsby (1979)
Cell-mediated lymphocytotoxicity directed against HLA-D gene products
Transpl. 27, 338 - 341

91. Natvig,J.B., S.S.Froland (1964)
Detection of a third lymphocyte-like cell type by rosette formation with erythrocytes sensitized by various Anti-Rh Antibodies
Scand. J. Immunol. 5, Suppl. 5

92. Terasaki,P.I., McClelland (1964)
Microdroplet assay of human serum cytotoxins
Nature 204, 998

93. Ouchterlony,Ö. (1948)
In: Progress in allergy, 1

94. Boyd,H., S.J.Leach, B.Milligan (1972)
N-acylsussunimides as acylating agents for proteins: the selective acylation of lysine residues
Int. J. Peptide Protein Res. 4, 117 - 122

95. Bolton,A.E., M.Hunter (1973)
The labelling of protein to high specific radioactivities by conjugation to a ^{125}J-containing acylating agent
Biochem. J. 133, 529 - 539

96. Fraker,P.J., J.C.Speck (1978)
Protein and cell membrane jodinations with a sparingly soluble chloramide
Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 849 - 857

97. Jondall,M. (1976)
SRBC rosette formation as a human T lymphocyte marker
Scand. J. Immunol. 5, Suppl. 5

98. Kermann,R.H., W.P.Geis
Total and active T cell dynamics in renal allograft recipients
Surgery 79, 4, 398 - 407

99. West, W.A., R.B. Boozer, R.B. Herbermann (1978)
Low affinity E-rosette formation by human K cell
J. Immunol. 120, 1, 90 - 95

100. Maier,B., D.Baron, W.Bessler, H.Bockhorn, H.Degen, T.Hark und G.Winkelmann (1982)
Die Inhibierung cellulärer in vitro immunreaktionen durch Herbicolin und Streptomycetenextrakt.
Langenbecks Archiv f. Chirurgie, Supplement, 31 - 35

101. H.Bockhorn, D.P.Baron, T.Hark, H.Degen, U.Hopt, G.H.Müller G.Winkelmann (1983)
Herbicolin, another cyclic peptide with immunosuppressive activities
Transpl. Proc. 15, 1, 560 - 563

102. Gershon, R.K. (1974)
T-cell control of antibody production
In: Contemp. Top. Immunobiol. 3, 1,

103. Gershon,R.K., B.Liebhaber (1972)
Suppressorcell induction by graft rejection
J. Exp. Med. 136, 112 - 117

104. Huber,B., O.Devinsky, R.K.Gershon,H.Cantor (1976)
Cell-mediated immunity:Delayed-type hypersensitivity and cytoxic responses are mediated by different T-cell sub-classes.
J.Exp. Med. 143, 1534 - 1539

105. Schlechter,B., S.Segal, M.Feldmann (1978)
Generation of Suppressor lymphocytes during sensitization in culture against syngeneic tumour.
J. Immunol. 120, 1268 - 1274

106. Bernstein,A., L.Sopori, J.E.Gose, P.M.Sondel (1979)
Modulation of immune response by alloactivated suppressor cells
Tranpl. Proc. 11, 1, 997 - 1001

107. Charpentier,B.M., P.Lang, B.Martin, D.Fries (1982)
Specific recipient-donor unresponsivness mediated by a suppressor cell system in human kidney allograft
Transpl. 33, 5, 470 - 477

108. Crispe,I.N., N.R.J. Gascoigne, P.K.Lai, N.A.Mitchison, T.Owens (1983)
Immunoregulation of the response to membrane alloantigens
Transpl. Proc. 15, 1, 685 - 688

109. Mitchison,N.A. (1982)
An immunoregulatory molecular complex with five active sites
Nature 239, 576

110. Sasportes,M. O.Fradelizi, J.Dausset (1978)
HLA-Dr specific human suppressor lymphocytes generated by repeated in vitro sensitization against allogeneic cells
Nature 276, 502 - 504

111. Plant,M, L.M.Lichtenstein, E.Gillespie, C.S.Henney (1973)
Studies on the mechanism of lymphocyte-mediated cytolysis
IV. Specifity of the histamine receptor on effector T cells
J.Immunol. 111, 389 - 394

112. Rocklin,R.E., D.Greineder, B.H.Littman, K.L.Melmon (1978)
Modulation of cellular immune function in vitro by histamine receptor-bearing lymphocytes: Mechanism of action
J. Clin. Immunol. 1, 1, 73 - 79

113. Rocklin,R.E., D.Greineder, K.L.Melmon (1979)

Histamine iduced suppressor factor (HSF): Further studies on the nature of the stimulus and the cell which produces it
Cell. Immunol. 44, 404 - 408

114. Rocklin,R.E., A.Haberdek-Davidson (1981)
Histamine activates suppressorcells in vitro using a co-culture technique
J. Clin. Immunol. 1, 1, 73 - 79

115. Smith,C.I., A.Svejgaard (1981)
Concanavalin A-induced suppressor lymphocytes in normal individuals
Scand. J. Immunol. 13, 483 - 492

116. Maier,B. (1982)
Die in vitro Beeinflußung allogener zellulärer Reaktionen durch verschiedene Thymianextrakte, Herbicolin und Streptomycetenextrakt
Diplomarbeit

117. Bockhorn,H., G.H.Müller, U.T.Hopt, H.Degen, D.Eisenmann, M.Smetak (1982)
Das Phänomen der Toleranzinduktion durch ein allogenes Lebertransplantat
Exp. Hepat., Suppl. 1982

118. Zimmermann,F.A., P.P.Knodel, H.F.S.Davies, J.M.Gokel, T.Schmid (1983)
The fate of orthotopic liver allografts in different rat strain combinations
Transpl. Proc. 15, 1, 1272 - 1275

119. Degen,H., H.Bockhorn, D.Baron, M.Smetak, D.Eisenmann, M.Jockheck, U.T.Hopt, G.Mueller, G.H.Müller (1983)

Suppressor cells and organ-specific antibodies in long-term surviving liver allografted pigs
Transpl. Proc. 15, 1, 737 - 739

120. Bockhorn,H., Schrempf-Decker,G., D.Baron (1980)
Der immunsuppressive Effekt lysosomaler Faktoren in der Leber
Langenbecks Archiv f. Chirurgie, Suppl. 82, 125 - 128

121. Cantor,H.M., A.E.Dumont (1967)
Hepatic suppression of sensetization to antigen absorbed into the portal system
Nature 215, 744 - 745

122. Müller,G.H. (1983)
A new and simple method of auxiliary livergrafts
Transpl., im Druck

123. Hart,D.N.J., J.W.Fabre (1981)
MHC-antigens on liver cells
J. Exp. Med. 153, 347 - 355

124. Polacios,R., G.Möller (1981)
Cyclosporin A blocks receptors for HLA-DR antigen on T-Cells
Nature 290, 792

125. Hess,A.B., P.J.Tuschka, G.W.Santos (1982)
Effect of Cyclosporin A on human lymphocyte responses in vitro
J. Immunol. 128, 355 - 364

126. Wagner,H. (1983)
Cyclosporin A: Mechanism of action
Transpl. Proc. 15, 1, 523 - 527

127. Carver,M., F.Thomas, R.Deepe, R.Warren, J.Thomas (1983)

Selective action of Rabbit antithymocyte globulin (RATG) on OKT 4 positive T cell subset in Rhesus monkeys
Transpl. Proc. 15, 1, 627 -630

128. Carter,N.P., P.R.Cullen, J.F.Thompson, A.L.T. Bewick, R.F.M. Wood, P.J.Morris (1983)
Monitoring lymphocyte subpopulations in renal allograft recipients
Transpl. Proc. 15, 1, 1157 - 1160

129. Agostino,G.J., B.D.Kahan, R.H.Kerman (1983)
Detection of nonspecific suppressor cells from normal individuals, uremic patients, and allograftet recipients
Transpl. Proc. 15, 1, 724 - 727

130. Thomas,F., H.M.Lee, R.R.Lower, J.Thomas (1980)
Value of immunological monitoring studies in human E, EA, EAC rosetting lymphocyte subpopulations in renal and cardiac transplantation
Eurotransplant meeting, Leiden, Preset. 60

131. Guttmann,R.D., R.S.Poulsen (1983)
Fluorescence activated cell sorter analysis of lymphocyte subsets after renal transplantation
Transpl. Proc. 15, 1, 1160 - 1163

LEBENSLAUF

21. 9. 1950	GEBOREN	in Uhingen, Kreis Göppingen, Baden-Württ.
	ELTERN	Theodor Degen, Karosserieflaschner Gertrud, geb. Kies
4.10. 1974	HEIRAT	mit Ursula, geb. Hanne, Arzthelferin
6. 1. 1981	GEBURT	von Sohn Marc

1957 - 1965	Besuch der Volksschule Uhingen
1965 - 1968	Maschinenschlosserlehre bei Fa. L.Schuler, Göppingen Besuch der gewerblichen Berufsschule in Göppingen
4.10. 1968	Maschinenschlosser-Facharbeiterbrief
1969 - 1970	Besuch der Berufsaufbauschule in Göppingen
1970 - 1972	Besuch der Technischen Oberschule in Stuttgart
22. 6. 1972	ABITUR an der Technischen Oberschule in Stuttgart
1973	Studium der Pädagogik an der Pädagogischen Hochschule in Esslingen
1974	Ableistung des Zivildienstes im Kreiskrankenhaus in Göppingen
1975 - 1976	Mathematik-Studium an der Universität Stuttgart
1975 - 1980	Biologie-Studium an der Universität Stuttgart
1979 - 1980	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zoologie im Biologischen Institut der Universität Stuttgart, ausgeführt an der Chirurgischen Klinik der Universität Tübingen, Abt. Experimentielle Chirurgie und Immunologie.
8. 9. 1980	DIPLOM IN BIOLOGIE
Nov. 1980 - Juni 1983	Dissertation an der Chirurgischen Klinik der Universität Tübingen, Abt. Experimentielle Chirurgie und Immunologie unter der Anleitung von Privatdozent Dr. D. Baron.

Meine akademischen Lehrer waren:

H. Allenstein, D. Baron, W. Bessler, H. Beyer, H. Bockhorn,
E. Fluck, M.v. Hedenström, D. Hülser, O.G. Issinger, K. Köhler,
U. Kull, P. Kunze, H.Chr. Mailänder, H. Mechelke, K.W. Mundry,
G. Pfleiderer, C. Schilde, M. Wabl, G.v. Wahlert, H. Wolff.